

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant

UMR 116 ISEM - CIRAD de Montpellier

THÈSE présentée par :

Marie-Raphaëlle ALMIN

soutenue le : 16 décembre 2015

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline / Spécialité : Biologie / Physiologie

**Etude des mécanismes induits par de fortes températures
stérilisantes chez un poisson tropical, le tilapia du Nil,
*Oreochromis niloticus***

THÈSE dirigée par :

M BAROILLER Jean-François
Mme DUITTOZ Anne

Directeur de Recherches, CIRAD - UMR ISEM, Montpellier
Professeur, Université François – Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

M FLAMENT Stéphane
Mme MARTINEZ Anne-Sophie

Professeur, CRAN UMR 7039 CNRS, Université de Lorraine
Docteur, HDR, UMR BOREA, Université de Caen Normandie

JURY :

M BAROILLER Jean-François
Mme DUITTOZ Anne
M FLAMENT Stéphane
Mme GOVOROUN Marina
Mme MARTINEZ Anne-Sophie
Mme ROUGEOT Carole

Directeur de Recherches, CIRAD - UMR ISEM, Montpellier
Professeur, Université François – Rabelais de Tours
Professeur, CRAN UMR 7039 CNRS, Université de Lorraine
Docteur, HDR, URA, INRA centre Val de Loire, Nouzilly
Docteur, HDR, UMR BOREA, Université de Caen Normandie
Docteur, Maître de conférence, Université de Liège, Belgique

A mes parents et Julien A.

Remerciements

En premier lieu, je souhaitais adresser mes remerciements au CIRAD qui a financé ce travail et ainsi contribué à la réalisation de mon projet de thèse.

Je souhaite adresser mes plus sincères remerciements à la direction du département Persyst, et plus particulièrement à Hervé Saint Macary pour son implication, sa disponibilité et son écoute.

Je remercie les membres de mon jury pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce manuscrit, leur disponibilité et leur compréhension. A Monsieur Stéphane Flament et Madame Anne-Sophie Martinez qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse. A Mesdames Marina Govoroun et Carole Rougeot d'avoir accepté d'en être les examinatrices.

Je tiens particulièrement à remercier mon directeur de thèse, Jean-François Baroiller, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire UMR 110 INTREPID du CIRAD de Montpellier dont il était Directeur à mon arrivée. Un grand merci de m'avoir permis de découvrir le monde de l'aquaculture et d'avoir travaillé sur un sujet d'actualité plus que passionnant. Un grand merci également à ma co-directrice de thèse, Anne Duittoz, qui fût par le passé responsable de mon Master 2, d'avoir gentiment accepté d'être le lien entre le CIRAD de Montpellier et l'Ecole Doctorale de Tours.

De même, je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse qui m'ont suivie, conseillée et corrigée tout au long de ma thèse : Béatrice Chatain, Helena D'Cotta Carreras, Marina Govoroun et Stefano Peruzzi.

Un grand merci à tout le personnel de la Plate-forme d'Histocytologie et d'Imagerie cellulaire Végétale (PHIV) de l'IFR 127 Daphné du campus Agropolis-Lavalette (CIRAD de Montpellier), plus particulièrement à Christine Sanier, Jean-Luc Verdeil et Marc Larthaux pour leurs conseils avisés et leur disponibilité.

Je souhaite également adresser mes remerciements aux différents laboratoires qui m'ont accueillie pour la mise en place de nouvelles méthodes de laboratoire.

Merci à l'ensemble du personnel de l'équipe E3 (Facteurs du milieu et mécanismes adaptatifs) du laboratoire de Biologie Intégrative des Organismes Marins de l'observatoire océanologique de Banyuls sur Mer pour son accueil, en particulier à Jack Falcon, le responsable, Laurence Besseau et Charles Hubert Paulin qui m'ont transmis leur savoir faire en hybridation in situ durant 1 mois.

Merci à Marina Govoroun de m'avoir permis de rencontrer Edith Gibert, technicienne de l'INRA de Nouzilly, qui m'a montré et appris la technique du TUNEL.

Merci à Valérie Rodriguez responsable de la plateforme de cytométrie en flux du CIRAD de Montpellier qui m'a accordé beaucoup de son temps pour me montrer cette technique et la transposer à mon modèle animal et nos marqueurs d'intérêt.

Je remercie aussi nos voisins de laboratoire sur le site CIRAD de Baillarguet pour leurs échanges scientifiques : Anne Geger, Denis Bastianelli, Laurent Bonnal, Elodie Babie.

Enfin, j'aurai toujours une pensée pour eux et je tiens à remercier l'ensemble des collègues de l'ex UMR 110, Olivier Mikolasek, Lionel Dabbadie, Frédéric Clota, Hugues de Verdal, Alain Vergnet, Denis Covès, les frères Lozano (je m'excuse s'il en manque) et plus particulièrement :

Béatrice Chatain pour ses précieux conseils scientifiques, surtout en statistiques, et son soutien permanent. Merci pour ta joie de vivre et ton enthousiasme au quotidien qui sont communicatifs ; ce fut un réel plaisir de travailler en ta compagnie.

Elodie Pepey, ton aide m'a été plus que précieuse pour la biologie moléculaire et nos discussions au bureau et en-dehors très enrichissantes. Merci de m'avoir autant soutenue et écoutée pendant ces quelques années.

Marc Canonne pour sa grande implication dans la gestion des installations expérimentales. Un grand merci pour ses longues heures passées sous la Serre ou au B05 à m'apporter les notions de zootechnie que je ne maîtrisais absolument pas à mon arrivée. Merci pour ton soutien lors des expérimentations animales et de ton aide précieuse lors des sexages !

Et bien sûr Brigitte Bournier, notre "maman de substitution" pendant ces années. Merci pour tes conseils avisés et ton implication sans faille dans l'ensemble des démarches administratives. Nos pauses déjeuners à refaire le monde me manqueront.

Et les derniers, mais pas des moindres, mes ex-collègues doctorants qui sont devenus des amis, Lucile Soler et Christian Ouedraogo. Merci pour votre soutien, l'environnement agréable du bureau, les longues discussions et les fous rires qui nous ont fait passer de bons moments ensemble et aidés à supporter les périodes plus difficiles.

Un énorme merci aux copains de promo. Alexia, Sarah et Tanguy merci pour vos encouragements et de m'avoir si gentiment écoutée tout au long de cette thèse.

Je souhaite également remercier toute ma famille et amis proches, plus ou moins jeunes, pour leurs encouragements.

Un immense merci à mes parents et Julien pour le soutien et la patience dont vous avez fait preuve à tous instants ! Sans votre aide et votre écoute si précieuses je n'en serais pas là aujourd'hui, je vous en suis infiniment reconnaissante !

Résumé

Face à la stagnation des produits de la pêche et à la demande croissante en protéines d'origine aquatique, l'aquaculture doit répondre au défi de l'intensification écologique. Chez les poissons, la reproduction peut affecter négativement la croissance, la qualité de la chair et/ou la résistance immunitaire; ainsi chez le tilapia, la reproduction précoce et continue affecte fortement la croissance des femelles. Par ailleurs, quand des individus fertiles s'échappent d'un élevage, des risques de pollution génétique sont possibles à travers leur reproduction avec des individus sauvages. La stérilisation est donc recherchée en aquaculture pour remédier à ces problèmes.

Nous avons caractérisé certains des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu lors d'une stérilisation induite par de fortes températures. L'effet d'une température élevée (37°C) sur le développement gonadique a été étudié pendant la différenciation sexuelle et la première maturation sexuelle chez des descendances génétiquement 100% femelles (XX) ou 100% mâles (XY) de tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus*, une espèce thermosensible d'intérêt majeur en aquaculture. L'analyse immunohistochimique de la protéine Vasa montre que des traitements à forte température provoquent une diminution du nombre de cellules germinales (CG), aboutissant à une stérilité partielle et transitoire ou complète et permanente. Cette réduction du nombre de CG résulte d'une augmentation du taux d'apoptose et d'une réduction du taux de prolifération de ces cellules. L'expression du gène *vasa*, marqueur des CG est inhibée dans les gonades des poissons traités à 37°C pendant un minimum de 60 jours ; cette diminution du taux de transcrits *vasa* est corrélée avec la réduction du nombre de CG dans ces gonades. La baisse du niveau d'expression des gènes *cyp19a1a* et *amh*, respectivement marqueurs de cellules somatiques femelles et mâles, suggère que la température de 37°C affecte également le nombre ou la fonctionnalité des cellules de la granulosa chez les femelles et de Sertoli chez les mâles. Le traitement à 37°C est plus efficace quand il est appliqué au stade alevin, et débute avant la différenciation sexuelle lorsque les gonades ne possèdent qu'une quarantaine de CG, qu'au stade juvénile lors de la première maturation sexuelle.

Un traitement de 60 jours est nécessaire pour induire de tels effets et semble impacter préférentiellement les gonades femelles. Ce travail confirme que les fortes températures induisent une réduction du nombre de CG, en modifiant la balance entre les taux d'apoptose et de prolifération cellulaire, conduisant ainsi à des stérilités partielles ou totales chez les femelles.

Mots clés : stérilité induite, fortes températures, cellules germinales, apoptose, prolifération

Résumé en anglais

The sterilization of farmed fishes is searched in aquaculture to remedy in the problems of inconvenient reproduction and risk of genetic pollution of reproduction of escaped farmed fishes into the natural environment with endemic species. We characterized some of the mechanisms involved during induced-sterilization by high temperatures in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, a thermosensitive species of major interest in fish farming.

The effect of 37°C-elevated temperature on gonadal development was studied during sexual differentiation in fry and during sexual maturation in juvenile, from mix-sexed (XX/XY), all-genetic female (XX) and male (XY) progenies. The immunochemistry analysis of vasa protein shows that 37°C-treatment causes germ cell (CGs) decrease, resulting from an increase of apoptosis rate and/or reduction of cell proliferation, leading to partial and transitory or complete and permanent sterilization.

This work confirms that high temperatures induce a decrease of germ cell number, modifying the balance between rates of cell apoptosis and cell proliferation, leading to partial or complete sterilization.

The expression profile of *vasa* gene, marker of germ cells, is inhibited in gonads of fish treated at least during 60 days at 37°C ; that is correlated with the reduction of germ cell number. The reduction of expression levels of *cyp19a1a* and *amh* genes, respectively markers of female and male somatic cells, suggests that the 37°C-temperature also affects the number or function of granulosa cells in females and Sertoli cells in males.

A treatment of 60 days is necessary to induce such effects and seems to impact preferentially female gonads.

Key-words : induced-sterilization, high temperatures, germ cell, cell apoptosis, cell proliferation

Table des matières

Remerciements.....	3
Résumé.....	5
Résumé en anglais	6
Table des matières	7
Abréviations	13
Partie 1 : Introduction	17
Contexte et problématique de la thèse : l'intérêt de la stérilisation en aquaculture	19
Synthèse bibliographique	23
1. Morphogenèse gonadique	24
1.1. Mammifères : formation de la gonade indifférenciée, différenciation testiculaire et ovarienne.	24
1.2. Poissons téléostéens	25
2. Gènes impliqués dans la gonadogenèse et la différenciation du sexe	28
2.1. Chez les mammifères	28
2.1.1. Différenciation testiculaire	30
Sex determination region Y (Sry)	30
Sry-box 9 (Sox9)	30
Fiber Fibroblast growth factor 9 (Fgf9)	30
L'hormone antimüllérienne (Amh).....	31
Les récepteurs à Amh (AmhR2).....	31
Steroidogenic factor 1 (Sf-1).....	31
2.1.2. Différenciation ovarienne.....	32
Wingless-related MMTV integration site 4 (Wnt4)	32
R-spondin-1 (Rspo1)	32
Forkhead-box-L2 ou Foxl2 et l'aromatase ou cytochrome P450arom ou cyp19a1	33
2.2. Chez les poissons téléostéens	33
2.2.1. Différenciation testiculaire	34
Déterminants majeurs du sexe.....	34
Sry-box 9 (Sox9)	34

Doublesex and mab-3 (DM)-related transcription factor1 (Dmrt1).....	35
Gènes codant pour les enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse	35
Hormone antimüllérienne (Amh)	36
Récepteur à l'amh de type II (AmhR2).....	37
2.2.2. Différenciation ovarienne.....	38
Aromatase ou cytochrome P450arom ou cyp19a1	38
Forkhead-box-L2 (Foxl2).....	38
3. Importance des cellules germinales et interactions cellules germinales - cellules somatiques	39
3.1. Spécification des cellules germinales primordiales.	39
3.1.1. Modèle de spécification induite des CGPs - exemple de la souris.....	40
Induction.....	40
Prolifération et migration	41
3.1.2. Modèle de spécification spontanée des CGPs - exemple poisson-zèbre.....	42
3.2. Vasa.....	43
3.2.1. Marqueur des cellules germinales	43
3.2.2. Exemple du tilapia du Nil.....	44
3.3. Rôle des cellules germinales	44
3.3.1. Cas du poisson-zèbre.....	44
3.3.2. Cas des mammifères.....	45
3.4. Interaction cellules germinales - somatiques	46
3.4.1. Cellules somatiques.....	46
3.4.2. Interactions cellulaires.....	46
Cas du médaka	46
Cas du poisson-zèbre.....	47
Cas des mammifères.....	47
3.5. Apoptose des CG en réponse à un stress environnemental (température) ou chimique	48
3.5.1. Cas du poisson-zèbre.....	48
3.5.2. Cas du pejerrey	48
3.5.3. Cas des mammifères.....	49
4. Facteurs externes influençant la différenciation et/ou la fertilité de la gonade.....	50

4.1.	Différenciation du sexe : masculinisation et féminisation	51
4.1.1.	Stéroïdes sexuels chez les mammifères et les téléostéens.....	51
	Voies de synthèse des androgènes et des œstrogènes	51
	Induction d'une inversion sexuelle par les hormones stéroïdiennes appliquées chez les alevins, avant et pendant la différenciation sexuelle.....	52
	Induction d'une inversion sexuelle par des inhibiteurs de l'aromatase, appliqués chez les adultes, après la maturation sexuelle.	55
4.1.2.	La température.....	57
	Chez les mammifères	57
	Chez les poissons	57
4.2.	La fertilité/stérilité.....	58
4.2.1.	Les méthodes de stérilisation utilisées en aquaculture	58
	Les manipulations génétiques : la triploïdisation.	58
4.2.2.	Méthodes de stérilisation envisagées en aquaculture	60
	Approche écologique : les températures stérilisantes.	60
	Une plante médicinale: la graine de papaye <i>Carica papaya</i>	62
4.2.3.	Méthodes efficaces, mais non autorisées en aquaculture	62
	Transgénèse	62
	Une molécule chimique le busulfan.	63
5.	Présentation de la thèse.....	65
5.1.	Modèle biologique : le tilapia du Nil, <i>Oreochromis niloticus</i>	65
5.1.1.	Taxonomie.....	65
5.1.2.	Biologie	66
	Comportement de reproduction.....	66
	La thermosensibilité	67
5.2.	Intérêt du contrôle du sexe et de la stérilisation en aquaculture.....	69
5.3.	Intérêt économique et importance du contrôle du sexe, chez le tilapia du Nil.	70
5.4.	Effet de la température sur la différenciation sexuelle du tilapia.....	74
5.5.	Stérilité et tilapia	76
	Utilisation des manipulations génétiques : la triploïdisation	76
	Utilisation d'une plante médicinale, la graine de papaye <i>Carica papaya</i>	78
	Objectifs du travail.....	81
	Partie 2 : Matériels et Méthodes	87

1. Animaux et expérimentations.....	89
1.1. Traitements températures des alevins	90
1.2. Traitements températures des juvéniles	90
1.3. Traitements au busulfan sur des alevins et des juvéniles	91
1.3.1. Administration par injection intra-péritonéale à la dose de 40 mg de busulfan/kg de poids vif	91
1.3.2. Administration par incorporation à l'alimentation aux doses de 40-80-160 mg busulfan/Kg d'aliment	92
1.4. Sexage	92
2. Extraction des ARN totaux, traitement DNase et Reverse transcription	93
2.1. Extraction des ARN totaux	93
2.2. Traitement DNase et Reverse transcription.	93
2.3. PCR quantitative en temps réel ou qPCR.....	93
3. Analyse histologique des gonades	95
4. Analyses immunohistochimiques des protéines Vasa et PCNA.....	95
4.1. Protocole élaboré sur la plateforme PHIV du CIRAD	95
4.2. Protocole élaboré par Histalim	96
5. Essai TUNEL	96
5.1. Protocole élaboré sur la plateforme PHIV	97
5.2. Protocole élaboré par Histalim	97
6. Acquisition d'images et comptage cellulaire.....	97
6.1. Auprès de la Plateforme PHIV du CIRAD	97
6.2. Auprès de la société Histalim.....	98
7. Analyses statistiques.....	98
Partie 3 : Résultats expérimentaux.....	99
Chapitre 1: Effets des températures stérilisantes sur les gonades femelles de tilapias du Nil, avant la différenciation et lors de la maturation sexuelle .	100
1. Description des types cellulaires ovariens chez le tilapia du Nil.....	101
1.1. Structure de l'ovaire.....	101
1.2. Types cellulaires germinaux.....	101

1.3. Types cellulaires somatiques.....	103
2. Article 1 : Etudes des mécanismes cellulaires et moléculaires d'une stérilisation induite par une haute température chez les femelles tilapia du Nil	104
2.1. Contexte, objectifs de l'étude et questions posées.....	104
2.2. Résultats majeurs.....	106
2.3. Discussion	109
2.4. Article n°1 : Mécanismes cellulaires et moléculaires de la stérilité induite par les hautes températures chez les femelles tilapias du Nil	112
Chapitre 2 : Effets des températures stérilisantes sur les gonades mâles de tilapias du Nil, avant la différenciation et lors de la maturation sexuelle .	141
1. Description des types cellulaires testiculaires chez le tilapia du Nil....	142
1.1. Structure du testicule	142
1.2. Types cellulaires germinaux (d'après Schulz <i>et al.</i> , 2005).....	142
1.3. Types cellulaires somatiques.....	144
2. Article n°2 : Etudes des impacts morphologiques et expressionnels générés par des températures élevées sur les cellules germinales et de Sertoli dans les gonades de mâles tilapias du Nil	145
2.1. Contexte, objectifs de l'étude et questions posées.....	145
2.2. Résultats majeurs.....	149
2.3. Discussion	151
2.4. Article n°2 : Les températures élevées génèrent des impacts morphologiques et expressionnels sur les cellules germinales et de Sertoli dans les gonades de mâles tilapias du Nil	154
3. Résultats additionnels	176
Chapitre 3: Effets d'un traitement par le busulan sur la différenciation sexuelle et le développement gonadique chez le tilapia du Nil, Oreochromis niloticus.....	178
1. Objectif de l'étude.....	180
2. Résultats et discussion des résultats	182

2.1. Expérimentation 1 : busulfan injecté en intra-péritonéal à une dose de 40 mg/kg de poids vif de poissons	182
2.1.1. Sex-ratio (SR ou phénotype gonadique), Index gonado-somatique (RGS) et survie	183
2.1.2. Structure cellulaire	185
2.2. Deuxième série d'expérimentation : busulfan dans l'aliment à des doses de 40, 80 et 160 mg/kg d'aliment	187
2.2.1. Sex-ratio (SR ou phénotype gonadique), Index gonado-somatique (RGS) et survie	187
2.2.2. Structure cellulaire	188
2.2.3. Y-a-t-il un impact du busulfan sur les cellules germinales des gonades de tilapias femelles et mâles ?	189
2.2.4. Au niveau moléculaire.	191
Profil d'expression du gène Vasa	192
Profil d'expression du gène amh	194
Profil d'expression du gène cyp19a1a	194
Discussion Générale	199
Conclusion.....	215
Bibliographie.....	221
Annexes.....	257

Abréviations

2n : diploïde	Cyp19a1 : aromatase
3n : triploïde	Cyp19a1a : aromatase gonadique
3β-HSD : 3-beta-hydroxystéroïde déshydrogénase	Cyp19a1b : aromatase cérébrale
11KT : 11-kétostérone	Cytochrome P45011β : 11β-hydroxylase
17βOH4 : 11-beta-hydroxyandrostenedione	Cytochrome P450arom : aromatase ou cyp19a1
17β-HSD : 17-beta-hydroxystéroïde déshydrogénase	Cytochrome P-450C17 : 17α-hydroxylase
17MT : 17-alpha-méthyltestostérone	Cytochrome P-450scc : cholesterol side chain clivage
°C : degrés	Dpc : jours après coït (days post-coitum)
% : pourcent	Dah : jours après naissance (days after hatching)
ADN : acides désoxyribonucléiques	Dpf : jours après fécondation (days post- fertilization)
ADNc : acides désoxyribonucléiques complémentaires	Dax1 : dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome 1, gene 1
ALT : aminotransférase alanine	Dazl : deleted in azoospermia-like
AST : aspartate	DDX4 : Dead Box Protein 4 ou Vasa
Amh : hormone antimüllérienne	Descendances monosexes femelles : descendances 100% femelles XX
AmhR2 : récepteur à Amh de type 2	Descendances monosexes mâles : descendances 100% mâles XY
AmhY : antimüllérienne hormone on the chromosome Y	DHT : dihydrotestérone
ARNm : acides ribonucléiques messagers	DM : doublesex and mab-3
ARNs : acides ribonucléiques	Dmrt1 : doublesex and mab-3 (DM)-related transcription factor1
ATD : 1,4,6-androstatriene-3-17-dione, inhibiteur de l'aromatase	Dmrt1Y : doublesex and mab-3 (DM)-related transcription factor1 on the Y chromosome
Bax : Bcl-2 -associated X protein	DT : jour de traitement (day of treatment)
BMPs : bone morphogenetic proteins	E2 : œstradiol
BV : vaisseau sanguin (blood vessel)	ED : canal efférent (efferent duct)
CE : épithélium cœlomique	Ef1 : elongation factor 1
CG : cellules germinales	Fancl : Fanconi anemia gene
CGP : cellules germinales primordiales	
CL : cellules de Leydig	
CPS : cellules produisant des stéroïdes	
CSE : cellules souches embryonnaires	
CTNNB1 : gène codant pour la β-caténine	

Fas : APO-1 ou CD95

FasL : Fas ligand

Fgf9 : fiber Fibroblast growth factor 9

Foxl2 : forkhead-box-L2

Fry-27°C : groupes d'alevins élevés à la haute température physiologique de 27°C

Fry-37°C : groupes d'alevins traités à la haute température de 37°C

Fsh : follicle stimulating hormone

Fshr : récepteur à la Fsh

GATA-4 : appartient à la famille des facteurs de transcription qui se lient au domaine "GATA" de l'ADN

GC : germ cells

Gcys : cellules germinales dans les cystes

GGC : cellules germinales goniales (gonial germ cells)

GnRH : gonadotropin-releasing hormone

GP : phénotype gonadique (gonad phénotype)

Gr : cellules somatiques de la granulosa

Granulosa : cellules somatiques de la granulosa

Gs : cellules seules like-cellules souches qui sont mitotiques (stem-like single cells are mitotic)

GSc : cellules entourant les cellules germinales (cells surrounding-germ cells)

GsdfY : gonadal soma derived growth factor on the Y chromosome

GtHs : gonadotropines

HE : coloration hématoxyline/éosine

HpF : heures post-fécondation (hours post-fertilization)

HMG : High Mobility Group

Hot : mutation hotei chez le médaka

IA : inhibiteur de l'aromatase

In : interstitium

Juv-27°C : groupes de juvéniles élevés à la température physiologique de 27°C

Juv-37°C : groupes d'alevins traités à la haute température de 37°C

KL : kit ligand

LH : Luteinizing hormone

MAT : mois après la fin du traitement (months after the end of the treatment)

MNE : expression de normalisation à la moyenne (mean normalization expression)

Mis : müllerian inhibiting substance

MT : 17-méthyltestostérone

Mvh : mouse vasa homolog

N : haploïde

Nanog : facteur de transcription fortement exprimé par les cellules souches pluripotentes

Nanos3 : protéine exprimée par les cellules germinales

Oc : cavité ovarienne (ovarian cavity)

Oct4 : octamer-binding transcription factor 4

Oo : ovocytes primaires (primary oocytes)

OGM : organisme génétiquement modifié

P : descendance (progeny)

P53 : tumor protein p53

P110Rb : hypophosphorylated form of retinoblastoma protein

PCNA : protein cellular nuclear antigen

PGC : primordial germ cells

PN1 : ovocytes périnucléaire primaire (primary perinuclear oocytes)

PN2 : ovocytes périnucléaire secondaire (secondary perinuclear oocytes)

PSG : gonades partiellement stériles (partially sterile gonads)

PVF : ovocytes prévitellogénique

(previtellogenic oocytes)

RIA : radioimmunoassay

Rspo1 : respondin-1

RT-PCR : real time- polymerase chain

Reaction

RTdT : enzyme terminal déoxynucléotide

transférase (the terminal deoxynucleotide

transferase enzyme)

sdY : sexually dimorphic on the Y

chromosome

SEM : erreur standard à la moyenne (standard

error of the mean)

Sertoli : cellules somatique de Sertoli

Sf-1 : steroidogenic factor 1

SG-STL : gonades stériles très fines (sterile

string like gonads)

SG-TSL : gonades stériles translucides (sterile

translucent gonads)

Sox2 : Sry-box 2

Sox9 : Sry-box 9

SPC : cellules productrices de stéroïdes

(steroid producing cells)

Sry : sex determination region Y

SSR : inversion sexuelle secondaire

STL : gonades stériles très fines (string-like

gonads)

TGF- β : Tumor necrosis factor-beta

TM : température masculinisante

TSD : déterminisme sexuel dépendant de la

température (temperature sex determination)

TSL : gonades stériles translucides

(translucent gonads)

Th : cellules somatiques de la thèque (theca

cells)

TPBS : tween phosphate buffered saline

TUNEL : Terminal Deoxynucleotide

Transferase dUTP nick end Labeling

Vas : forme longue de vasa chez le tilapia du

Nil

Vas-s : forme raccourcie dans la région 5' de

vasa chez le tilapia du Nil

Vasa : DEAD-box (Asp-Glu-Ala-Asp)

helicase protein (aso called DDX4)

VF : ovocytes vitellogéniques (vitellogenic

oocytes)

VS : vaisseau sanguin

Wnt4 : wingless-related MMTV integration

site 4

Wt-1 : Wilms tumor suppressor

XX : femelle génétique (en particulier chez le

tilapia du Nil)

XY : mâle génétique (en particulier chez le

tilapia du Nil)

ZZ : sexe homogamétique mâle chez le

pleurodèle

Partie 1 : Introduction

Contexte et problématique de la thèse : l'intérêt de la stérilisation en aquaculture

Pour répondre à une augmentation croissante de la consommation des produits aquatiques dans un contexte de stagnation des pêches, tout en soignant son image de marque, l'aquaculture doit réussir sa transition vers une intensification davantage raisonnée, voire même écologique. La stérilisation peut constituer une première réponse à ce défi. Ainsi, elle peut permettre de produire plus et mieux. Produire plus, car chez les poissons, les interactions reproduction-croissance sont particulièrement importantes. En effet, la reproduction a souvent un impact négatif sur la croissance des individus. C'est particulièrement vrai chez des espèces, qui peuvent se reproduire plusieurs fois au cours d'une même saison de reproduction. C'est précisément le cas du tilapia dont la maturité sexuelle est précoce et la reproduction continue (en moyenne, une femelle tilapia peut se reproduire une fois par mois, voire davantage si les œufs sont retirés de sa cavité buccale) si les conditions de température et de photopériode sont favorables. Empêcher la reproduction permet alors de stimuler la croissance. Parallèlement, l'aquaculture est souvent critiquée pour les interactions entre espèces/populations d'élevage et sauvages. Les conséquences peuvent être des pollutions génétiques, résultant de la reproduction de poissons échappés des élevages avec des individus du milieu naturel, ou une compétition voire une prédation entre espèces/populations d'élevage et espèces/populations sauvages qui remplace progressivement les populations naturelles, ou encore une contamination par des parasites ou pathogènes. Ainsi, en moyenne dans les années 2008, on répertoriait 500 000 saumons échappés chaque année des cages norvégiennes ; en conséquence, les saumons échappés des élevages représentaient la moitié des pêches de cette espèce sur les côtes norvégiennes (Bentsen et Thodesen, 2008).

Une stérilisation systématique des populations d'aquaculture permettrait donc de s'affranchir des possibles pollutions génétiques engendrées par l'aquaculture, tout en bénéficiant d'une meilleure croissance moyenne des poissons.

L'élevage de poissons stériles est donc de plus en plus préconisé par de nombreux états (USA, Europe), organisations non-gouvernementales, ainsi que par des agences indépendantes nationales ou internationales pour limiter les impacts de l'aquaculture sur les ressources naturelles. La triploïdisation est aujourd'hui la technique considérée comme la plus pratique, la plus économique et la plus efficace pour la production de poissons stériles à grande échelle

(Maxime, 2008). Selon la réglementation en vigueur au niveau de la Commission Européenne, les poissons triploïdes ne sont pas considérés comme des OGM (Directive 2001/18/EC Parlement Européen – Article 2 – Annexe IA – partie 2). Mais les avis des consommateurs et associations écologistes vis-à-vis de ces manipulations chromosomiques restent contrastés (Piferrer *et al.*, 2009). Un traitement alternatif, non chromosomique, qui serait probablement mieux accepté par le consommateur, constitue donc un enjeu majeur pour l'aquaculture.

Dans ce contexte, ce travail de thèse a pour objectif principal d'étudier les effets d'une stérilisation induite par les hautes températures sur le développement gonadique des femelles et mâles chez le tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus*. Et ainsi identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires pouvant être impliqués dans cette stérilisation.

Nous nous sommes également intéressés à un autre mode de stérilisation induite par un produit chimique, le busulfan.

J'aborderai dans une première partie, nommée synthèse bibliographique, l'ensemble des connaissances nécessaires à la compréhension de mon sujet de thèse. Elle se structure autour de six sous-parties : les deux premières décriront la morphogénèse gonadique et listeront les principaux gènes impliqués dans la gonadogenèse ainsi que la différenciation du sexe chez les mammifères et les poissons téléostéens. Une troisième sous-partie, primordiale, exposera l'importance des cellules germinales et l'interaction de celles-ci avec les cellules somatiques dans les gonades de mammifères et de certains poissons téléostéens. Ensuite, une quatrième sous-partie portera sur les facteurs externes influençant la différenciation et/ou la fertilité des gonades de mammifères et poissons téléostéens. Cette partie exposera aussi les méthodes de stérilisation utilisées ou envisagées en aquaculture, ainsi que celles connues pour être efficaces, mais à proscrire pour cause d'éthique, de réglementation ou de risque pour l'environnement ou le consommateur, seront énumérées dans une cinquième sous-partie. La dernière, appelée "présentation de la thèse" exposera le modèle animal choisi, le tilapia du Nil, et l'intérêt du contrôle du sexe et de la stérilisation en aquaculture.

A la fin de cette synthèse bibliographique, les 2 objectifs de ma thèse susciteront 6 questions.

La deuxième partie comportera les protocoles détaillés mis en œuvre pendant mes travaux de recherches.

L'ensemble des résultats sera exposé dans une troisième partie ; les résultats expérimentaux liés à l'objectif principal ont donné lieu à deux articles qui constitueront les deux premiers chapitres. Le second objectif n'a pas fait l'objet d'une publication et sera présenté sous forme de résultat et discussion dans le chapitre 3.

La quatrième partie est la discussion générale qui permettra de tirer les conclusions sur la base des résultats obtenus et de proposer des perspectives découlant de ce travail (cinquième partie).

Enfin, les références bibliographiques nécessaires à l'élaboration de ma synthèse bibliographique et de mes différentes discussions feront l'objet d'une sixième partie.

Synthèse bibliographique

1. Morphogenèse gonadique

1.1. Mammifères : formation de la gonade indifférenciée, différenciation testiculaire et ovarienne.

Chez les mammifères, comme chez les autres vertébrés, les ébauches gonadiques sont bipotentielles et constituées de trois parties : l'épithélium germinale qui deviendra le cortex gonadique, le mésenchyme qui formera le stroma et le blastème du mésonéphros (amas de cellules indifférenciées) qui constituera la médulla gonadique. Chez la souris *Mus musculus*, la gonade indifférenciée ressemble à un blastème composé des cellules germinales primordiales (CGP) et des précurseurs des cellules somatiques et n'a pas d'organisation épithéliale. A ce stade, les CGP, d'origine mésoblastique, colonisent la crête génitale de la gonade (McLaren, 1994). Ces CGP atteignent le territoire gonadique à 10-11 dpc (days post-coïtum), où elles vont proliférer intensivement.

Chez le fœtus mâle, la différenciation des cellules de Sertoli est le premier événement de l'organogenèse du testicule chez la souris (à partir de 13,5 dpc ; Magre et Jost, 1991). Ces cellules s'associent progressivement par des jonctions de type *adherens* et englobent les cellules germinales pour former l'ébauche des cordons séminifères. L'étape suivante est l'apparition des cellules de Leydig ou cellules interstitielles. Chez l'adulte, les testicules sont des organes pairs dotés de fonctions spermatogène, mais aussi endocrine. La fonction spermatogène est assurée par les tubes séminifères qui, à partir de la puberté, sont le lieu de la production en continu des spermatozoïdes. Dans ces tubes séminifères, les cellules de la lignée germinale mâle (spermatogonies, spermatocytes et spermatides) sont associées à des cellules de soutien nommées cellules de Sertoli. Le tissu interstitiel, quant à lui, est composé en partie de vaisseaux sanguins, macrophages, tissu conjonctif et cellules de Leydig. Ces dernières ont une activité stéroïdogénique et sont donc le lieu de la sécrétion des androgènes (hormones stéroïdes mâles) dans le testicule. Une de ces hormones, la testostérone assure le développement du tractus génital mâle à partir des canaux de Wolff (**Figure 1**).

Chez le fœtus femelle, l'ovaire conserve un aspect indifférencié alors que la différenciation testiculaire est déjà engagée. Au cours du développement de l'ovaire fœtal, les ovocytes se regroupent avec des cellules somatiques au sein de structures épithéliales appelées cordons ovariens. A l'initiation de la folliculogenèse, les cordons ovariens ou ovigères se fragmentent

et les follicules primordiaux se forment par l'association d'un ovocyte entouré d'une assise de cellules somatiques, précurseurs des cellules de la granulosa. Ensuite, les cellules de la thèque se différencient autour des follicules en croissance (**Figure 2**). Chez les mammifères, la présence des cellules germinales est indispensable à la morphogenèse ovarienne. En effet, la folliculogenèse n'a pas lieu lors d'une déplétion massive en cellules germinales produite par une mutation génétique (mutation white spotting ou steel chez la souris) ou induite par un facteur exogène (irradiation, produit chimique tel que le busulfan) ; des cordons ovariens stériles se forment et vont régresser progressivement jusqu'à prendre l'aspect d'une bandelette fibreuse ne contenant que du stroma.

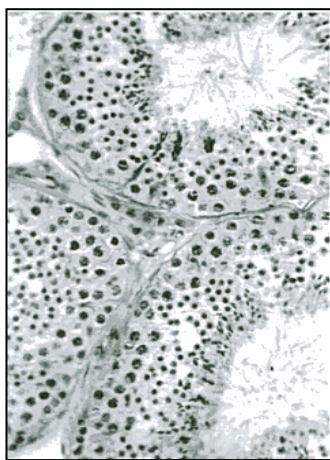


Figure 1. Coupe histologique d'un testicule adulte de mammifère montrant des sections de tubes séminifères entourées d'espace interstitiel occupé par des amas de cellules de *Leydig* (x 1700) (d'après Danoune et Demoulin, 2001).

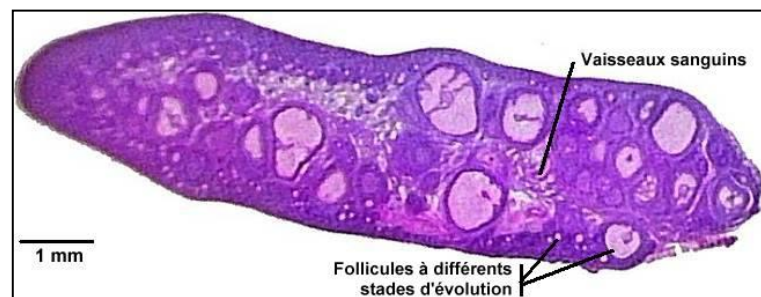


Figure 2. Coupe histologique d'un ovaire de lapine montrant des follicules à différents stades d'évolution et des vaisseaux sanguins. Observation à la loupe (x7) (d'après Fages et Gueuné, 2005).

1.2. Poissons téléostéens

Chez le tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus*, comme chez les autres téléostéens, les CGP sont formées à l'extérieur de la gonade indifférenciée et vont migrer pour coloniser les crêtes génitales (Wilhelm *et al.*, 2007). Selon les équipes de recherche, les étapes de développement sont exprimées en jours après éclosion, qui se produit 4 jours après la fécondation chez le tilapia du Nil (dah : days after hatching), ou en jours après fécondation (dpf : days post fertilization). Dans ce travail de recherche, nous obtenons pour cette dernière. Dès 7-8 dpf, les CGP sont morphologiquement différentes des cellules somatiques (Kobayashi *et al.*, 2008 ;

Kobayashi, 2010) et le nombre des cellules germinales ne présente pas de dimorphisme sexuel jusqu'à 12 dpf chez le tilapia. Les cellules germinales primordiales (CGP) sont d'origine extra-embryonnaire, elles proviennent de l'endomésoderme et vont ensuite migrer pour se regrouper à la racine du mésentère dorsal chez le tilapia (Nakamura et Takahashi, 1973).

Chez l'alevin et le juvénile, de 14 à 24 dpf, la future gonade mâle possède quelques grosses cellules primordiales et des cellules stromales entourant celles-ci ; en moyenne, 48 CGP sont observées dans les gonades d'un alevin indifférencié de 9 dpf (Baroiller, 1988 ; D'Cotta *et al.*, 2001a). Ce n'est qu'après 18 dpf que les mâles XY vont connaître une augmentation de leurs nombres de CGs (Baroiller, 1988 ; Kobayashi *et al.*, 2000 ; D'Cotta *et al.*, 2001a ; Kobayashi *et al.*, 2008) alors que la prolifération des CG est visible dès 12 dpf chez les femelles XX. Les cellules somatiques en différenciation vont aussi croître progressivement durant ce stade et quelques vaisseaux sanguins se développent dans le tissu stromal. De 27 à 30 dpf, des cellules stromales caractéristiques, les précurseurs des cellules de Leydig (CL), apparaissent à proximité des vaisseaux sanguins. Ces cellules ont un noyau circulaire ou ovale avec des circonvolutions et une grande quantité de cytoplasme. Les CL sont également retrouvées avec les cellules de Sertoli à proximité des gonies (Nakamura, 2013). La formation des canaux efférents intra testiculaires a lieu à partir de 29 dpf dans les gonades XY (Kobayashi *et al.*, 2008). De 34 à 54 dpf, moment où les lobules commencent à être observés, les testicules montrent une augmentation graduelle du nombre de CG (D'Cotta *et al.*, 2001a ; Baroiller *et al.*, 2009), mais aussi des cellules somatiques. Les CL apparaissent dans les régions interstitielles situées entre les spermatogonies à 54 dpf. La première méiose testiculaire prend place autour de 55 dpf (Baroiller, 1988 ; D'Cotta *et al.*, 2001a ; Baroiller *et al.*, 2009). Les cystes se forment lorsque les cellules de Sertoli sont associées aux spermatogonies primaires ou de type A (Koulish *et al.*, 2002) aux alentours de 74 dpf chez le tilapia (Nakamura, 2013). A ce stade, il y a beaucoup de CL dans les régions interstitielles situées entre les cystes de spermatogonies. Par contre, les CL proches des vaisseaux sanguins restent en faible nombre. Chez l'adulte, la spermatogenèse a lieu dans des cystes localisés dans les tubes séminifères. A part cet arrangement en cystes, la spermatogenèse des téléostéens est très similaire à celle des mammifères et le développement et la fonction de l'épithélium séminifère sont dépendants de façon critique de la présence des cellules somatiques testiculaires, en particulier les cellules de Sertoli, les cellules de Leydig et les cellules myoïdes périlobulaires (Schulz et Miura, 2002). Chez certaines espèces, comme le tilapia du Nil, la spermatogenèse peut débiter dès 104 dpf. A ce stade, des cystes contenant

des cellules germinales à des stades variés sont distribués dans tout le testicule (**Figure 3**). Des clusters de CL sont détectables dans tout le tissu interstitiel. La présence de nombreuses mitochondries, de réticulum endoplasmique et de ribosomes indique une stéroïdogenèse active (Nakamura, 2013).

Les ébauches gonadiques femelles comprennent des ovogonies et quelques cellules stromales entourant les CG. Ces CG ont une forme circulaire avec un cytoplasme clair et un gros noyau (Nakamura, 2013). Le premier dimorphisme sexuel observable entre les alevins mâles et femelles de tilapias du Nil est le nombre de CG (Baroiller *et al.*, 2009). En effet, une prolifération des CG est observée à partir 19 dpf chez les femelles XX, tandis que le nombre de CG reste stable chez les mâles XY (Baroiller, 1988 ; D'Cotta *et al.*, 2001a ; Kobayashi, 2010). Ce dimorphisme est dû à un rapide taux des mitoses des CG chez les femelles formant des clusters caractéristiques (**Figure 4**) et, est généralement suivi par le début de la méiose se produisant dans les ovaires à partir de 28 dpf (D'Cotta *et al.*, 2001a). De 34-39 dpf, l'ovaire contient des cystes d'ovocytes pré-méiotiques et ceux-ci sont en contacts intimes les uns avec les autres. Leurs noyaux sont larges en taille et localisés au centre du cytoplasme (Nakamura, 2013). Quelques vaisseaux sanguins se développent au sein du tissu stromal. Baroiller (1988) et D'Cotta *et al.*, (2001a) rapportent que les premières cellules méiotiques ovariennes sont détectées de 28 à 35 dpf dans les gonades XX ; Kobayashi et Nagahama (2009) les observent à la même période (39 dpf). C'est également à ce moment que la cavité ovarienne est formée (D'Cotta *et al.*, 2001a ; Kobayashi et Nagahama, 2009). Des cellules proéminentes sont aussi observables dans la vacuité des vaisseaux sanguins qui sont localisés dans le tissu stromal. Ces cellules ont un noyau de forme circulaire ou ronde, mais leurs membranes nucléaires ont des circonvolutions et sont considérées comme étant les précurseurs des CPS (cellules produisant des stéroïdes) (Nakamura, 2013). Il y a une remarquable augmentation du nombre de cystes pré-méiotiques dans les ovaires de 44 à 54 dpf qui a pour conséquence une augmentation en taille de l'ovaire. Une nette augmentation du nombre de CPS est également observable dans la région incluant les vaisseaux sanguins (**Figure 3**). Les CPS apparaissent en même temps que la formation de la cavité ovarienne. L'augmentation du nombre de CPS coïncide avec la multiplication des ovogonies et la différenciation des ovogonies en ovocytes. Ces observations suggèrent que les stéroïdes produits jouent un rôle non seulement dans la différenciation stromale (formation de la cavité ovarienne), mais également dans la différenciation des CG.

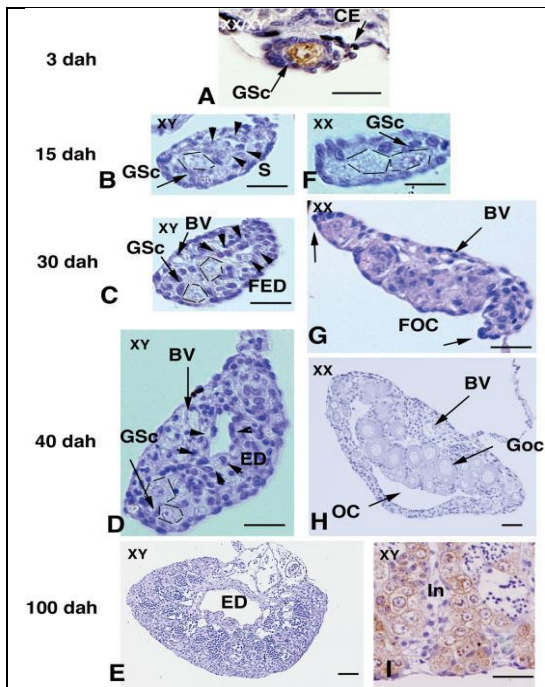


Figure 3. La différenciation gonadique chez le tilapia du Nil. A: gonade indifférenciée à 3dah. CE, épithélium cœlomique ; GSc, cellule entourant les cellules germinales. B-E,I: gonades XY. F-H: gonades XX. Les lignes pointillées représentent les cellules germinales goniales ; S, masse de cellules médullaires ; BV, vaisseaux sanguins ; FOC, formation de la cavité ovarienne ; FED, formation du canal efférent ; Goc, ovocyte en croissance ; Oc, cavité ovarienne ; ED, canal efférent ; In, Interstitium. (d'après Kobayashi *et al.*, 2008). A,I: les cellules germinales sont marquées avec un anticorps anti-vasa (d'après Kobayashi *et al.*, 2002). Echelle 20µm pour A-H et 30µm pour I.

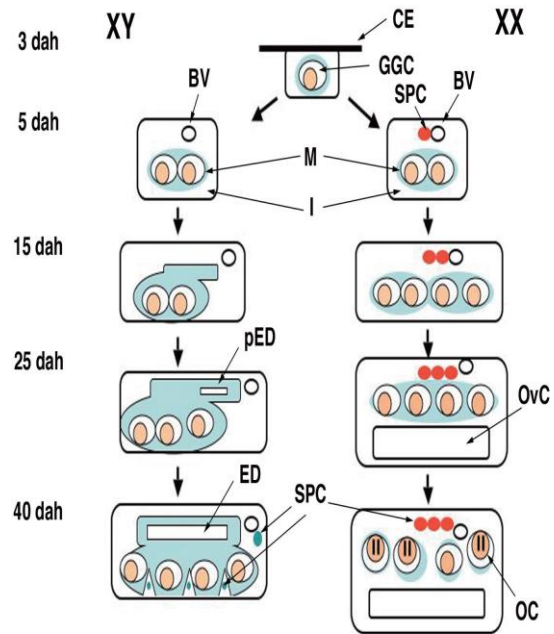


Figure 4. Dimorphisme sexuel durant la différenciation gonadique chez le tilapia du Nil. Schéma de l'histogenèse gonadique pendant la différenciation du sexe. CE, épithélium cœlomique ; GGC, cellules germinales goniales ; SPC, cellules stéroïdogéniques ; BV, vaisseaux sanguins ; OvC, cavité ovarienne ; pED, ébauche du canal efférent ; Oc, ovocyte ; ED, canal efférent intra-testiculaire ; M, cellules médullaires ; I, interstitium ; dah, days after hatching (d'après Kobayashi, 2010).

2. Gènes impliqués dans la gonadogenèse et la différenciation du sexe

2.1. Chez les mammifères

Le déterminisme du sexe, qui conduit à la différenciation de la gonade bipotentielle en testicule ou en ovaire, repose sur deux cascades de gènes, dits mâles (*Sox9*, *Amh* et *Dmrt1*) ou femelles (*Rspo1*, *Wnt4*, *Dax1*, *Foxl2*, *aromatase*) spécifiques. Ceux-ci vont, lorsqu'ils seront exprimés, d'une part activer les gènes de leur propre cascade, mais aussi inhiber la cascade opposée (Kim et Capel, 2006 ; Jacob et Lovell-Badge, 2011). Le mécanisme le plus direct

chez une espèce à hétérogamétie mâle XY repose sur l'existence d'un gène majeur, *Sry*, localisé sur le chromosome Y qui gouverne la cascade mâle chez la majorité des mammifères (SRY chez l'homme). Il ne semble pas exister de facteur comparable déterminant la cascade femelle, mais c'est plutôt un niveau d'expression de *Sox9* insuffisant pour inhiber l'expression des gènes nécessaires à la différenciation et au maintien de l'ovaire tels que *Rspo1* et *Wnt4* qui est en cause (Graves et Peichel, 2010) (**Figure 5**). Deux gènes, *Fgf9* (fiber Fibroblast growth factor 9) (facteur promouvant la voie mâle) et *Wnt4* (wingless-related MMTV integration site 4) (facteur promouvant la voie femelle) sont exprimés dans les gonades bipotentiels indifférenciées. Ces gènes agissent comme des signaux, qui, durant la détermination sexuelle, contrôleraient le destin de la lignée cellulaire de soutien, cellules qui supportent la croissance et la maturation des cellules germinales (Barske et Capel, 2008).

Chez le mâle, les cellules de Sertoli sécrètent, dès le début de la différenciation testiculaire, l'hormone antimüllérienne (*Amh*) et le facteur de transcription *Sox9* qui sont des gènes clés de la cascade mâle. En effet, le déterminant majeur du sexe *Sry*, porté par le chromosome Y, va déclencher la différenciation des cellules de Sertoli, *via* l'activation du gène *Sox9* qui induit la différenciation des cellules de Sertoli et l'expression de l'*Amh* par ces dernières, chez les mammifères.

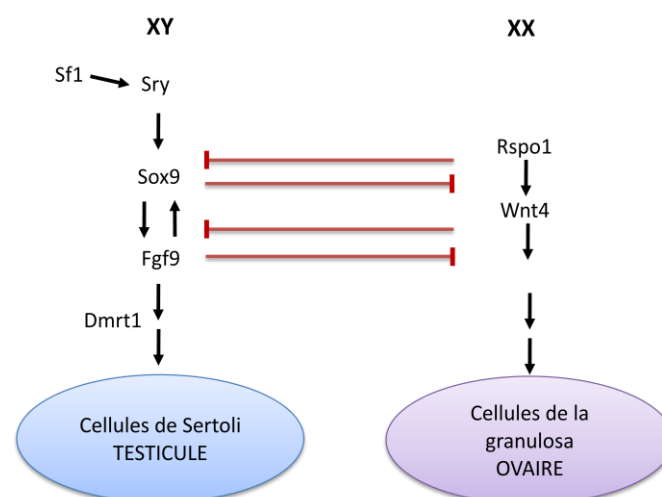


Figure 5. Relations antagonistes entre les cascades déterminant le développement des testicules ou des ovaires chez les mammifères. La cascade mâle est représentée à gauche et la femelle à droite (d'après Graves et Peichel, 2010).

2.1.1. Différenciation testiculaire

Figure 6

Sex determination region Y (Sry)

Le gène *Sry* est porté par l'extrémité du bras court du chromosome Y chez les mammifères. La transcription du gène *Sry* pendant la vie fœtale chez la souris est limitée à la période de formation des crêtes urogénitales entre 10,5 et 12,5 dpc (Koopman *et al.*, 1990). *Sry* est exprimé initialement par les précurseurs des cellules de Sertoli, juste avant la formation des cordons séminifères, pour permettre aux cellules de soutien de se différencier vers la voie mâle. Puis, dans le testicule adulte, les cellules germinales sont le siège de l'expression de *Sry* ; celui-ci étant fortement exprimé dans les cellules méiotiques et post-méiotiques, ce qui indique que *Sry* est notamment impliqué dans l'initiation de la différenciation des gonades mâles.

Sry-box 9 (Sox9)

Sox9 appartient à la famille des gènes SOX, caractérisés par l'existence d'un domaine de fixation à l'ADN de type HMG. La détection de l'expression de *Sox9* dans les gonades de souris commence vers 10.5 dpc dans les deux sexes et augmente chez le mâle dans les cellules de Sertoli au cours de la différenciation testiculaire, en relation avec l'apparition de l'expression de *Sry*. *Sox9* est la cible de *Sry* et c'est un gène clé dans la différenciation testiculaire (DiNapoli et Capel, 2008), puisqu'il régule notamment l'expression de l'*Amh* dans les cellules de Sertoli (Yao et Capel, 2005). La délétion de *Sox9* peut causer une réversion sexuelle de mâle en femelle (Wagner *et al.*, 1994 ; Chaboissier *et al.*, 2004), tandis que sa duplication ou sa sur-activation conduit à une réversion sexuelle de femelle en mâle (Huang *et al.*, 1999 ; Bishop *et al.*, 2000 ; Vidal *et al.*, 2001).

Fiber Fibroblast growth factor 9 (Fgf9)

Le facteur de croissance *Fgf9* agit positivement sur l'expression de *Sox9* chez les mâles (Nef et Vassalli, 2009). Ce facteur est lui-même régulé par *Sox9*. Chez les mâles, *Sox9* et *Fgf9* répriment le régulateur de transcription β -caténine et le facteur de signalisation intercellulaire *Wnt4*, qui permet le développement des ovaires chez les femelles (Kim et Capel, 2006 ; Nef et Vassalli, 2009).

L'hormone antimüllérienne (Amh)

L'*Amh*, encore nommé *Mis* (Müllerian inhibiting substance) appartient à la famille des TGF- β , au même titre que les BMPs (Bone Morphogenetic Protein). Chez les mammifères, l'*Amh* est présente dès les premiers stades de la différenciation du testicule et elle atteint son taux maximum pendant toute la période de régression des canaux de Müller. Elle chutera ensuite à la puberté. Chez les amphibiens, par contre, l'*Amh* joue vraisemblablement aussi un rôle important dans la différenciation gonadique, mais pas dans la régression du canal de Müller (comme chez les mammifères) puisque ce canal persiste chez les amphibiens mâles.

Les récepteurs à Amh (AmhR2)

Chez les mammifères, des études effectuées sur les récepteurs à l'*Amh* ont montré que différents facteurs de transcription comme *Sox-9*, *Sf-1*, *Wt-1* et *GATA-4*, stimuleraient l'expression de l'*Amh*. Chez la souris, *Sf-1* contrôlerait quantitativement son expression et *Sox9* son déclenchement. Son action est médiée par deux récepteurs transmembranaires à activité sérine thréonine kinase : le récepteur de type II liant l'hormone et le type I transmettant le signal en phosphorylant des protéines cytoplasmiques de type Smad qui vont ensuite réguler dans le noyau l'expression de gènes cibles. Le récepteur de type 2 de l'*Amh* (*AmhR2*) a été cloné dans plusieurs espèces de mammifères : rat, souris, lapin et humain. La présence de son ARNm a été mise en évidence par hybridation *in situ*, Northern blot ou RT-PCR au niveau du mésenchyme des canaux de Müller, des cellules de Sertoli fœtales et post-natales, des cellules de Leydig adultes ainsi que dans les cellules de la granulosa des follicules ovariens après la naissance.

Steroidogenic factor 1 (Sf-1)

Sf-1 est un récepteur nucléaire qui régule la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la stéroïdogénèse (17 α -hydroxylase, 3 β -HSD ou 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase) et le développement des gonades. Le facteur *Sf-1* est détecté dès le 9e jour de gestation chez la souris au niveau des ébauches des gonades quel que soit le sexe et participe à la mise en place des crêtes génitales (Ikeda *et al.*, 1994). *Sf-1* agit positivement sur *Sry*. Celui-ci stimule *Sox9* qui régule *Fgf9*, assurant la différenciation des cellules de Sertoli et la répression de *Wnt4* chez la souris, (DiNapoli et Capel, 2008 ; **Figure 5**). Il agit également en synergie avec d'autres facteurs de transcription (*Sox9*, *Wt1* et *Dax-1*) et régule *in vivo* et *in vitro* la transcription du gène de l'hormone antimüllérienne (*Amh*) (Arrango *et al.*, 1999). Dans le

testicule fœtal, le déclenchement initial de la stéroïdogénèse dépendrait de façon dose-dépendante de l'expression du gène *Sf-1*.

2.1.2. Différenciation ovarienne

Figure 6.

En l'absence de *Sry*, les signaux promouvant le développement femelle pourraient causer l'inhibition de la cascade mâle et le déclenchement de la différenciation ovarienne chez les mammifères (DiNapoli et Capel, 2008).

Wingless-related MMTV integration site 4 (Wnt4)

Wnt4 appartient à la famille WNT, constituée de glycoprotéines riches en cystéines. Ce sont des facteurs de signalisation extracellulaires impliqués dans le développement (Cadigan et Nusse, 1997). Chez les mammifères Wnt4 est essentiel au développement rénal, à la différenciation de l'ovaire et du tractus génital féminin (Stark *et al.*, 1994). Il est exprimé uniquement dans les ovaires chez les mammifères. En son absence, les gonades des femelles génétiques XX sont partiellement masculinisées chez la souris (Vainio *et al.*, 1999). Par contre, chez la grenouille *Rana rugosa* (comme chez la tortue *Trachemys scripta*), Wnt4 ne montre pas d'expression sexuellement dimorphique dans les gonades (Oshima *et al.*, 2005 ; Shoemaker *et al.*, 2007b).

R-spondin-1 (Rspo1)

La différenciation ovarienne chez la souris est induite par l'activation de la voie de signalisation canonique WNT/CTNNB1 (Maatouk *et al.*, 2008), par *Rspo1* et *Wnt4* (Parma *et al.*, 2006 ; Vainio *et al.*, 1999). De même que *Wnt4*, *Rspo1* est surexprimé dans les gonades XX des embryons à 11,5 dpc (Nef *et al.*, 2005 ; Parma *et al.*, 2006). *Rspo1* n'est pas seulement requis pour la différenciation ovarienne, mais aussi pour la différenciation testiculaire chez la souris (Chassot *et al.*, 2012). En effet, des fœtus de souris XY *Wnt4*^{-/-} et *Rspo1*^{-/-} présentent des testicules hypoplasiques, qui résultent d'une importante réduction du nombre de tubes séminifères. La prolifération cellulaire dans la région coelomique est significativement réduite ainsi que le nombre de précurseurs des cellules de Sertoli chez les mutants XY knockout pour *Rspo1* et *Wnt4*, comparés aux gonades des individus contrôles. Ceci suggère, qu'en plus de leur rôle dans la différenciation ovarienne, *Rspo1* et *Wnt4* agissent

en synergie pour réguler la prolifération cellulaire dans la gonade précoce des deux sexes (Chassot *et al.*, 2012).

Forkhead-box-L2 ou Foxl2 et l'aromatase ou cytochrome P450arom ou cyp19a1

Chez les mammifères, il a été mis en évidence que la Fsh stimule la synthèse des œstrogènes par régulation transcriptionnelle du gène de l'aromatase (Dorrington *et al.*, 1975 ; Fitzpatrick et Richards, 1991). *Foxl2*, en se liant sur le promoteur de l'aromatase, aurait pour rôle d'activer son expression chez la chèvre (Prueitt et Zinn, 2001) et il est essentiel pour le maintien de la fonction ovarienne chez la souris (Ottolenghi *et al.*, 2005).

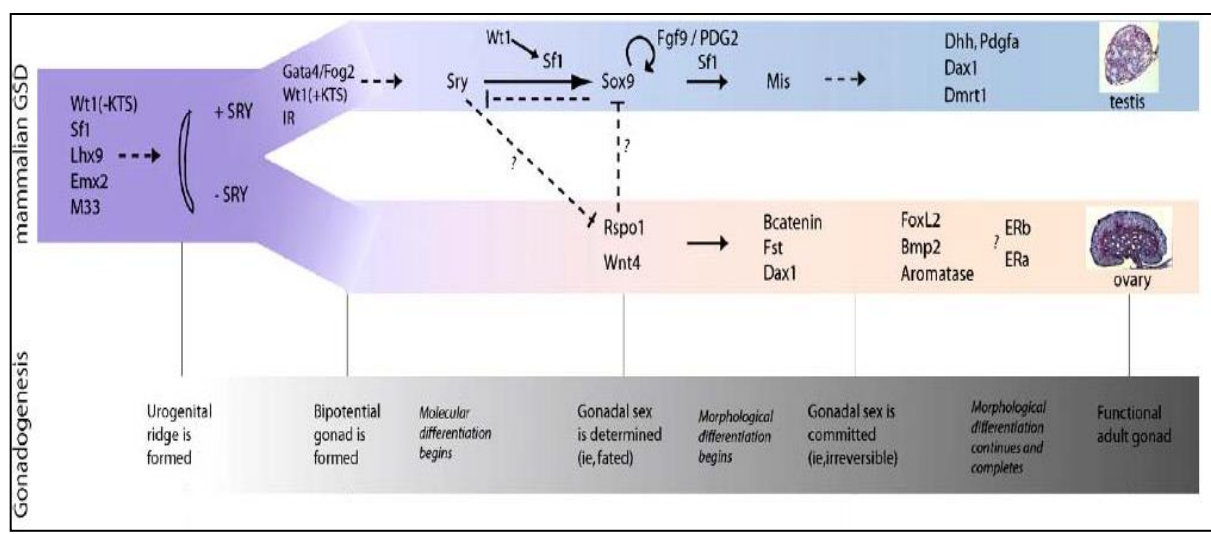


Figure 6. Représentation schématique des événements génétiques qui ont lieu lors de la détermination et la différenciation gonadique chez les mammifères GDS. Les lignes continues représentent les relations de régulation directe alors que les lignes discontinues montrent les relations indirectes (modifié d'après Shoemaker et Crews 2009).

2.2. Chez les poissons téléostéens

Le développement gonadique implique de nombreuses interactions entre les cellules germinales et les cellules somatiques, et met en jeu de nombreux gènes essentiels dans la différenciation du sexe qui sont hautement conservés durant l'évolution chez les vertébrés. Aussi, j'ai choisi de n'aborder que quelques gènes de la différenciation du sexe, mâle et femelle, chez les poissons ainsi que les déterminants du sexe connus chez certaines espèces gonochoriques.

2.2.1. Différenciation testiculaire

Déterminants majeurs du sexe

Les systèmes de déterminisme du sexe sont très variés chez les poissons téléostéens (Mank et Avise, 2009) et contrairement aux mammifères, ils ne sont pas conservés d'une famille ou même d'une espèce à l'autre. La plupart de ces déterminants sont issus de la duplication de gènes connus pour être impliqués dans la différenciation du sexe. *Dmrt1Y* (aussi appelé *dmrt1bY*) est le premier déterminant majeur découvert chez le poisson (et même chez les vertébrés non mammaliens). Situé sur le chromosome Y du médaka *Oryzias latipes*, *dmrt1Y* est issu d'une duplication du gène autosomal *dmrt1* (Matsuda *et al.*, 2002 ; Nanda *et al.*, 2002 ; Matsuda *et al.*, 2003) ; il n'est pas conservé chez la plupart des autres espèces du genre *Oryzias*. En effet, chez *Oryzias luzonensis*, *gsdfY* (gonadal soma derived growth factor on the Y chromosome) a récemment été découvert par Myosho *et al.* (2012) comme étant le déterminant majeur du sexe de ce poisson. Chez le pejerrey *Odontesthes hatcheri*, ce déterminant est l'*amhY*, qui est une duplication de l'hormone anti-müllérienne (*amh*), et est situé sur le chromosome Y (Hattori *et al.*, 2012). Le déterminant majeur du sexe a également été découvert chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*, par Yano *et al.* en 2012. Il s'agit de *sdY* (sexually dimorphic on the Y chromosome). Celui-ci est à ce jour le seul déterminant du sexe ne correspondant pas à une duplication d'un gène connu pour être impliqué dans la différenciation sexuelle ; on ne peut toutefois exclure l'hypothèse que ce gène soit aussi impliqué dans la cascade, sans avoir été pour l'instant identifié comme tel. Il est également le déterminant majeur du sexe chez la plupart des autres espèces de salmonidés (Yano *et al.*, 2013).

Sry-box 9 (Sox9)

Le gène *sox9* a été identifié chez plusieurs espèces comme la truite arc-en-ciel (Vizziano *et al.*, 2007), le poisson-zèbre *Danio rerio* (Chiang *et al.*, 2001 ; von Hofsten *et al.*, 2005) et le médaka (Yokoi *et al.*, 2002). Deux gènes sont généralement trouvés, comme c'est aussi le cas chez le tilapia du Nil où *sox9a* et *sox9b* ont été clonés par notre équipe (D'Cotta *et al.*, 2007). Des niveaux élevés d'expression de ces deux gènes ont été rapportés dans les gonades XY de 20 à 25 dpf (D'Cotta *et al.*, 2007). Deux gènes *sox9*, *sox9a1* et *sox9a2*, ont aussi été identifiés chez la truite arc-en-ciel et *sox9a1* présente un dimorphisme sexuel d'expression ; en effet, des niveaux plus élevés d'expression sont observables chez les mâles avant la différenciation sexuelle (Vizziano *et al.*, 2007). Ces données suggèrent que

sox9 interviendrait dans le développement testiculaire tardif. Chez le médaka, l'expression de *sox9a2* dans les cellules somatiques est équivalente dans les deux sexes durant les stades précoces de la différenciation gonadique. Ensuite, elle est régulée positivement chez les mâles, au stade de la formation des lobules testiculaires ; l'*amh* joue alors un rôle dans le développement des lobules testiculaires et non dans la détermination sexuelle chez cette espèce (Nakamoto *et al.*, 2005 ; Nakamura *et al.*, 2008).

Doublesex and mab-3 (DM)-related transcription factor1 (Dmrt1)

Dmrt1 fait partie de la famille des gènes à domaine DM (*doublesex* et *mab-3*). Ce gène est homologue du gène *mab3* de *Caenorhabditis elegans* et du gène *doublesex* de *Drosophila melanogaster*. Il est très conservé dans toutes les classes de vertébrés, s'exprime dans les crêtes génitales et au niveau des testicules adultes (Raymond *et al.*, 1999 ; Matsuda *et al.*, 2007 ; Ijiri *et al.*, 2008 ; Yoshimoto *et al.*, 2008). Chez la truite arc-en-ciel, *dmrt1* est exprimé dans les gonades mâles et il est impliqué dans la différenciation testiculaire (Vizziano *et al.*, 2007). De même, *dmrt1* est fortement exprimé dans les gonades mâles adultes de tilapias du Nil (Guan *et al.*, 2000), et n'est pas exprimé dans les gonades femelles (Ijiri *et al.*, 2008). Récemment, Wang *et al.* (2010) ont démontré que *dmrt1* réprime la transcription du gène de l'aromatase gonadique *cyp19a1a*, engendrant la répression de la production d'œstrogènes et ayant pour conséquence la suppression de la voie de différenciation femelle dans les gonades des tilapias. Chez le médaka, *dmrt1* influence également la différenciation testiculaire (Kobayashi *et al.*, 2004 ; Matsuda *et al.*, 2005). A la différence des espèces énumérées ci-dessus, *dmrt1* ne présente pas de dimorphisme sexuel d'expression chez le poisson-zèbre ; il est exprimé dans les gonades indifférenciées des deux sexes, ce qui suggère qu'il pourrait jouer un rôle dans le développement gonadique mâle comme femelle (Guo *et al.*, 2005).

Gènes codant pour les enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse

Dans le testicule fœtal, 4 enzymes interviennent dans la biosynthèse de la testostérone à partir du cholestérol : P-450_{scc} (cholesterol side chain cleavage qui coupe la chaîne latérale), 3β-HSD (3β-hydroxystéroïde déshydrogénase), P-450C17 (17α-hydroxylase) et la 17β-HSD (17β-hydroxystéroïde déshydrogénase). Les poissons convertissent l'androstènedione et la testostérone en androgènes 11-oxygénés, dont la 11-kétostérone (11KT) est la forme majeure (Baroiller, 1988 ; Baroiller *et al.*, 1999). L'enzyme responsable de cette synthèse est la 11β-hydroxylase (P45011β) (**Figure 9**). Le gène codant pour cette

enzyme est fortement exprimé dans les testicules en différenciation des mâles XY chez la truite arc-en-ciel (Guiguen *et al.*, 1999 ; Govoroun *et al.*, 2001). Au contraire, aucune différence entre les mâles et les femelles n'est observée chez le tilapia durant la différenciation gonadique (D'Cotta *et al.*, 2001b) et les niveaux de 11KT dans les testicules restent bas (Baroiller et D'Cotta, 2001).

Hormone antimüllérienne (Amh)

Cas de la majorité des poissons téléostéens

Chez les mammifères, en l'absence de l'*Amh*, les canaux de Müller se développent en trompes de Fallope, utérus et vagin ; chez le mâle, l'*Amh* permet donc la régression des canaux de Müller. Ces canaux sont par contre absents chez les poissons téléostéens. Cependant, des orthologues de l'*amh* trouvés chez les téléostéens montrent un profil de dimorphisme sexuel d'expression durant la différenciation gonadique et/ou à l'âge adulte chez plusieurs espèces comme la truite arc-en-ciel (Baron *et al.*, 2005), le poisson-zèbre (Rodriguez Mari *et al.*, 2005), le bar *Dicentrarchus labrax* (Halm *et al.*, 2007) et le tilapia du Nil (Poonlaphdecha *et al.*, 2011). Chez les adultes, les profils d'expression de l'*amh* varient d'une espèce à l'autre ainsi qu'en fonction du stade de développement. Ijiri *et al.* (2008) ont rapporté qu'elle commence à être exprimée dans la gonade indifférenciée des individus génétiques XY, mais aussi XX chez le tilapia, et ensuite, lors de la différenciation sexuelle, son expression augmente fortement dans la gonade mâle, mais pas dans la gonade femelle. Au niveau du système nerveux central, Poonlaphdecha *et al.* (2011) ont aussi mis en évidence un important dimorphisme sexuel très précoce, déjà existant à 10 dpf, de l'expression de l'*amh* chez les mâles tilapias du Nil, bien avant l'apparition du dimorphisme sexuel d'expression de ce gène au niveau des gonades. Ces données suggèrent que la différenciation cérébrale se ferait plus précocement que la différenciation sexuelle gonadique. Chez le poisson-zèbre, au stade juvénile, elle s'exprime uniquement au niveau des gonades mâles et est absente dans les gonades femelles, alors qu'au stade adulte, elle est visible dans les gonades mâles et femelles ; elle est hautement exprimée dans les cellules de Sertoli entourant les cystes testiculaires (Rodriguez-Mari *et al.*, 2005 ; Schulz *et al.*, 2007) et dans les follicules en croissance, au niveau de l'ovocyte, mais aussi dans la région folliculaire (Von Hofsten *et al.*, 2005). Plus récemment, il a été démontré que l'*amh* inhibait la sécrétion des androgènes, la prolifération et la différenciation des spermatogonies dans des cultures organiques de testicules d'adultes poisson-zèbre (Skarr *et al.*, 2011). En ce qui concerne la truite arc-en-ciel, l'expression de cette hormone est détectée dans les deux sexes dès 28 dpf. Néanmoins, après 37 dpf, l'*amh* est

fortement exprimée dans la gonade mâle et est détectée dans les cellules somatiques proches des cellules germinales (Vizziano *et al.*, 2007), suggérant qu'elle a un rôle durant la différenciation testiculaire. Fernandino *et al.* (2008b) ont montré que l'*amh* est plus exprimée à des températures masculinisantes de 29°C qu'à des températures féminisantes de 17°C durant la différenciation gonadique du pejerrey.

Cas du médaka

Le médaka a la particularité de ne pas avoir de dimorphisme sexuel d'expression de l'*amh* lors de la différenciation sexuelle. En effet, son expression est détectée dans la gonade des alevins mâles et femelles au niveau des cellules somatiques entourant les CGP tandis que dans le testicule adulte, celle-ci est seulement détectée dans les cellules somatiques entourant les spermatogonies et les spermatoocytes (Klüver *et al.*, 2007).

Récepteur à l'amh de type II (AmhR2)

Cas du médaka

L'identification du gène *amhR2* chez le médaka représente la première caractérisation de ce gène chez les vertébrés non-mammaliens (Klüver *et al.*, 2007). L'expression de l'*amh* et de l'*amhR2* dans les cellules somatiques (cellules de Sertoli pour les mâles et cellules de la granulosa pour les femelles) est identique entre les deux sexes, durant le développement gonadique des stades larvaires et juvéniles. Ceci suggère que ces deux gènes sont impliqués dans le développement gonadique et la régulation de la prolifération des cellules germinales dans les deux sexes chez cette espèce. La mutation *hotei* (hot) est une substitution critique d'un amino-acide (Y390C) sur le gène *amhR2* (Morinaga *et al.*, 2007). Cette mutation entraîne une prolifération excessive des cellules germinales, quelque soit le sexe. Elle conduit à une hypertrophie gonadique, l'inversion sexuelle de 50% des poissons XY homozygotes hot, ainsi qu'une initiation prématurée des méioses chez les mâles homozygotes hot et un arrêt du développement folliculaire à un stade précoce chez les femelles homozygotes hot. La transmission mendélienne récessive de cette mutation ainsi que le 'sauvetage' du phénotype mutant par un transgène *amhR2* suggèrent que la mutation hot cause la perte de fonction de l'*amhR2* dans la voie de signalisation *amh/amhR2*. Il a aussi été démontré par Shiraishi *et al.* (2008) que l'*amh* est requise et indispensable pour la prolifération des CG durant la différenciation précoce de la gonade chez le médaka. En effet, la perte de la fonction de l'*amh* ou de l'*amhR2* chez cette espèce entraîne la suppression de la prolifération des CG pendant la différenciation sexuelle. L'*amh* stimulerait indirectement la prolifération des CG, *via* son

récepteur *amhR2*, exprimé dans les cellules somatiques immédiatement après qu'elles aient atteint la gonade primordiale.

L'aromatase ou *cyp19a1* catalyse la production des œstrogènes à partir des androgènes. L'*amh* inhibe également l'activité des œstrogènes, suggérant que des interactions réciproques se font entre ces deux voies de signalisation.

2.2.2. Différenciation ovarienne

Aromatase ou cytochrome P450arom ou cyp19a1

L'aromatase est l'un des premiers gènes étudiés chez les téléostéens durant la différenciation du sexe. Le cytochrome P450 aromatase est l'enzyme stéroïdogénique responsable de la conversion des androgènes en œstrogènes. Il est dupliqué en 2 gènes, *cyp19a1a* (la forme gonadique) et *cyp19a1b* (la forme cérébrale). Le gène *cyp19a1a* ou aromatase gonadique (également nommée P450aromA, *cyp19a* ou *cyp19a1* dans la littérature) est fortement exprimé chez les femelles XX et très peu ou pas exprimé chez les mâles XY chez le tilapia du Nil (D'Cotta *et al.*, 2001b ; Kwon *et al.*, 2001). Il en est de même chez la truite-arc-en-ciel (Guiguen *et al.*, 1999 ; Govoroun *et al.*, 2001) et aussi chez d'autres espèces de poissons telle la plie japonaise, *Paralichthys olivaceus* (Kitano *et al.*, 2000). De nombreuses études ont montré que l'aromatase gonadique est un acteur clé de la différenciation ovarienne. Quelques cellules positives à l'aromatase gonadique peuvent être détectées dès 14 dpf chez le tilapia du Nil par hybridation *in situ* et immunohistochimie (Devlin et Naghama, 2002). Ces cellules sont des cellules de la granulosa. Une activité aromatase est identifiée dans les gonades femelles de 24 dpf pendant la phase de multiplication goniale et avant l'apparition des premières méioses femelles (Baroiller *et al.*, 2014). A cette même période (18-26 dpf), de forts niveaux d'œstradiol sont mesurés dans un pool de gonades génétiquement femelles tandis qu'ils restent faibles dans le pool de gonades génétiquement mâles (D'Cotta *et al.*, 2001 ; Baroiller et D'Cotta, 2001 ; Baroiller *et al.*, 2014). A l'échelle des transcrits, une expression de l'aromatase gonadique est mise en évidence dès 9 dpf dans les gonades d'alevins génétiquement femelles mais pas dans celles des mâles (D'Cotta *et al.*, 2001 ; Kwon *et al.*, 2001 ; Ijiri *et al.*, 2008 ; Poonlaphdecha *et al.*, 2013).

Forkhead-box-L2 (Foxl2)

Foxl2 est le gène codant pour un facteur de transcription winged helix/forkhead qui joue un rôle important dans la différenciation ovarienne chez les téléostéens (Liu *et al.*, 2007). Chez

deux espèces, le tilapia et le médaka, l'expression de *foxl2* est initialement détectée dans les cellules somatiques entourant les cellules germinales dans les gonades femelles ayant débuté leur différenciation ovarienne. Son expression est maintenue dans les cellules de la granulosa tout au long du développement ovarien, principalement dans les follicules pré-vitellogéniques et vitellogéniques (Wang *et al.*, 2004 ; Nakamoto *et al.*, 2006). Deux gènes, *foxl2a* et *foxl2b*, ont été clonés chez la truite arc-en-ciel. L'expression de *foxl2* est corrélée à celle de *cyp19a1* chez le tilapia (Wang *et al.*, 2007), la truite arc-en-ciel (Baron *et al.*, 2004), la plie japonaise (Yamaguchi *et al.*, 2007) et le médaka (Nakamoto *et al.*, 2007). Chez la plie, *foxl2* régule *in vitro* l'expression de l'aromatase durant la différenciation sexuelle (Yamaguchi *et al.*, 2007).

3. Importance des cellules germinales et interactions cellules germinales - cellules somatiques

Les gonades des poissons, comme les autres vertébrés, contiennent deux lignées cellulaires : la lignée germinale et la lignée somatique. La ségrégation de ces deux types cellulaires est l'un des événements très précoces du développement embryonnaire. Les interactions entre les CG et les cellules somatiques sont essentielles pour la différenciation et le développement gonadique (Murray *et al.*, 2010).

3.1. Spécification des cellules germinales primordiales.

En reproduisant sexuellement des organismes, les cellules germinales primordiales (CGP) donnent naissance à des gamètes qui sont responsables du développement d'un nouvel organisme dans la génération suivante. Ces cellules doivent rester totipotentes, c'est-à-dire être capables de se différencier en différents types cellulaires correspondant à chaque organe. Dans de nombreux organismes, l'entretien de la totipotence est atteint par la spécification des cellules germinales au début de l'embryogenèse (Raz, 2000). Il existe 2 modèles de spécification des cellules de la lignée germinale :

- induite par des interactions cellulaires (mammifères)
- spontanée par localisation des déterminants cytoplasmiques d'origine maternelle (drosophiles, xénopes, zébrafish)

3.1.1. Modèle de spécification induite des CGPs - exemple de la souris

Induction

Chez les mammifères, la spécification des cellules germinales est induite par des interactions cellulaires et a lieu à un stade très précoce du développement, au moment de l'implantation du blastocyste. La masse de cellules internes du blastocyste est la source des cellules épiblastiques aussi bien que des cellules souches embryonnaires (CSE). Ces cellules épiblastiques sont équipotentes et vont donner naissance aux cellules somatiques et germinales (Lawson *et al.*, 1991).

Chez la souris, deux voies de signalisations sont requises pour la spécification des CGP, et des interactions ont lieu entre elles. La voie de signalisation des BMPs (bone morphogenetic protein) est la principale voie de signalisation impliquée dans le développement du mésoderme et la spécification des CGPs. BMP4 et BMP8b sont sécrétés à partir de l'ectoderme extra-embryonnaire. Après l'implantation embryonnaire à E6.5 (stade embryonnaire de 6.5 jours), ils agissent au niveau de l'épiblaste proximal pour induire la formation des CGP à partir de quelques cellules situées dans la partie postérieure de l'embryon (Lawson *et al.*, 1999 ; Ying *et al.*, 2001). BMP4 est suffisant pour induire les CGP, tandis que BMP8b contrôle le développement de l'endoderme viscéral qui entoure l'épiblaste. Cet endoderme viscéral exprime BMP2 qui augmente probablement le signal de BMP4 dans l'embryon postérieur (Ying *et al.*, 2001 ; Ying et Zhao, 2001). BMP4 agit *via* un complexe de récepteurs, incluant le récepteur de type II des BMPs et ALK3/6, et résulte en la phosphorylation du complexe SMAD1/5 dans le cytoplasme (**Figure 7**). Ceux-ci vont ensuite former un complexe avec SMAD4 et se translocaliser dans le noyau pour contrôler l'expression de gènes cibles nécessaires à la spécification des CGP, tels que *Vasa*, *Nanos*, *Mago*, *Nashi* ... (Saffman et Lasko, 1999). La seconde voie de signalisation requise pour l'induction des CGP est la voie WNT, médiée par WNT3/ β -CATENIN (Aramaki *et al.*, 2013 ; **Figure 7**). WNT3 est exprimé en premier lieu à E5.5 dans l'endoderme viscéral postérieur, puis dans l'épiblaste postérieur à E5.75 (Rivera-Pérez et Magnuson, 2005), des stades qui précèdent la spécification des CGP. Une des cibles en aval de WNT3 est le gène T qui code pour le facteur de transcription T-box, T-BRACHYURY. Une étude récente, menée par Aramaki *et al.*, (2013), a démontré que l'expression de T-BRACHYURY est aussi essentielle et suffisante pour induire la spécification des CGP. De plus, T-BRACHYURY en se fixant à

des amplificateurs (enhancers), situés à proximité des gènes *Prdm1* et *Prdm14*, pourrait activer l'expression de ces gènes (**Figure 7**).

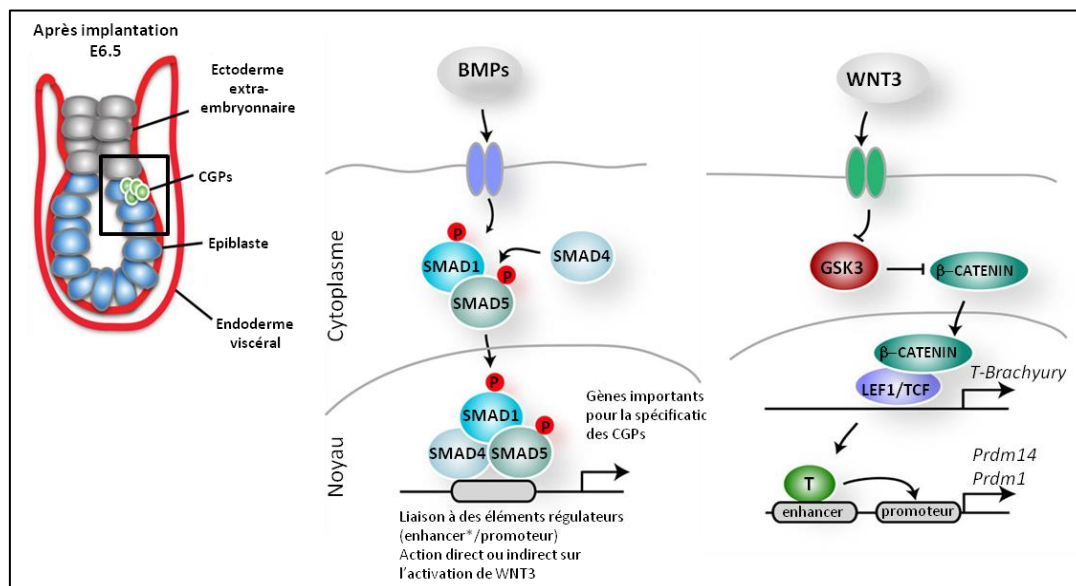


Figure 7. Formation des CGPs à partir de quelques cellules situées dans la partie postérieure de l'épiblaste qui est en contact avec l'ectoderme extra-embryonnaire. Modèle d'induction de la spécification des CGPs par 2 voies de signalisation cellulaire : BMPs et WNT3/β-CATENIN, chez la souris (d'après Günesdogan *et al.*, 2014).

Prolifération et migration

En plus des gènes spécifiques des cellules germinales, tels que *Nanos3*, *Vasa*, *Dazl*, *Mvh*, les CGP de souris expriment aussi des gènes associés à la pluripotence, tels que *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*. *Nanog* n'est pas indispensable à la spécification des CGP mais est essentiel pour le maintien des cellules germinales. *Sox2*, quant-à-lui, est détecté dans les CGP à partir de E7.5 et régule l'expression de *Kit*, qui est impliqué dans la survie et la prolifération des CGP (Irie *et al.*, 2014). Dès le stade E7.5, les CGP sont identifiables et forment un cluster d'environ 40 cellules, à l'extrémité postérieure de la lignée primitive, à la base de l'allantoïde de l'embryon de souris (Ginsburg *et al.*, 1990). Elles poursuivent ensuite leur migration *via* le mésentère dorsal (E7.75) pour atteindre le territoire gonadique à E10-11 (Richardson et Lehmann, 2010). Il a été démontré *in vitro* que les crêtes génitales exercent un chimiotactisme positif sur les CGP, par l'intermédiaire de facteurs, et que le TGF-β pourrait être l'un d'entre eux. De plus, le récepteur à tyrosine kinase c-kit et son ligand Kit Ligand (KL), interviennent dans la multiplication et la migration des CGP (McLaren 1994). Chez les embryons femelles souris, les CGP continuent à proliférer jusqu'à E13.5, stade auquel leur nombre avoisine les 25 000 et elles entrent ensuite en prophase I de méiose (Speed, 1982).

3.1.2. Modèle de spécification spontanée des CGPs - exemple poisson-zèbre

A la différence des mammifères, chez d'autres organismes, les CGP se différencient de façon spontanée par la localisation de déterminants maternels, présents sous forme d'ARNm et de protéines, dans le cytoplasme germlinal de l'embryon, dès les premiers stades embryonnaires (**Figure 8**). Chez ces espèces, *Vasa* semble être l'un des facteurs majeurs du développement de la lignée germinale, tandis qu'il n'aurait qu'un rôle mineur dans la mise en place de celle-ci chez des espèces à spécification induite (mammifères, Wylie, 1999).

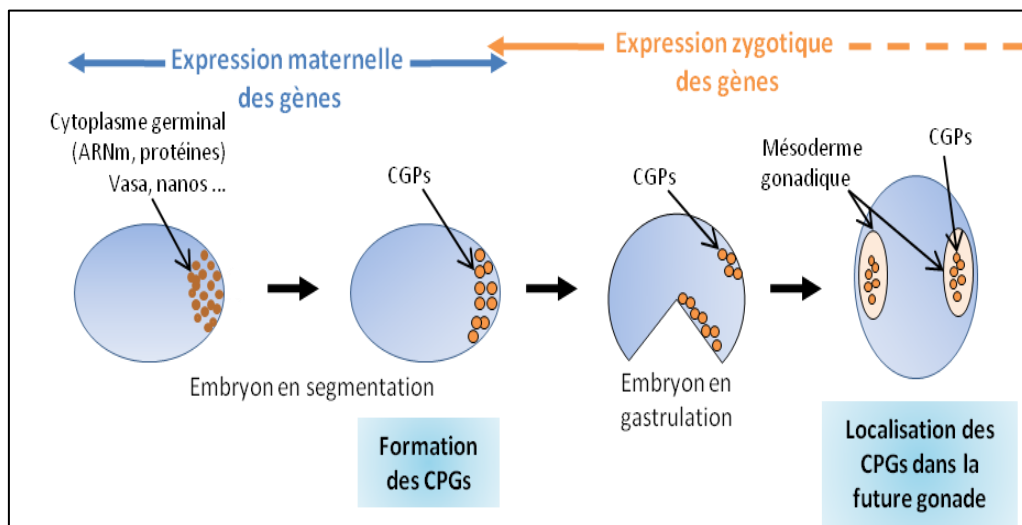


Figure 8. Modèle de spécification des CGP par localisation des déterminants d'origine maternelle (ARNm/protéines) contenus dans le cytoplasme de l'embryon, chez des organismes tel que le poisson-zèbre. CGPs : cellules germinales primordiales (modifié d'après Fabioux, 2004).

Chez le poisson-zèbre, la spécification des CGP semble dépendre du cytoplasme germlinal, dans lequel de nombreuses molécules d'ARNn d'origine maternelle résident, telles que *vasa* et *nanos*. L'identification du gène homologue *vasa* chez le poisson-zèbre a permis de décrire le développement des CGP de cette espèce. Les ARNs de cet homologue *vasa* peuvent-être localisés au niveau des clivages, dès les stades 2 et 4 cellules, dans les embryons de poisson-zèbre et sont ensuite exprimés dans les CGP (Yoon *et al.*, 1997). Par hybridation *in situ* de *vasa*, des CGP sont identifiables aux niveaux des somites 2 et 3, dès le stade de développement 5 somites des embryons (12h après la fécondation (hpf). Ces CGP sont de grosses cellules par rapport aux cellules somatiques qui les entourent (Yoon *et al.*, 1997). La protéine *vasa* est également présente dans les cellules germinales, du début de la spécification à la maturation de celles-ci, mais aussi de la différenciation à l'établissement de la gonade adulte mâle ou femelle chez le poisson-zèbre (Braat *et al.*, 2000). Pour analyser le rôle de

vasa dans le développement de la lignée germinale du poisson-zèbre, des mutants *vasa*^{sa6158} ont été produits. Il s'avère que *vasa* zygotique n'est pas essentiel pour le développement précoce de la lignée germinale étant donné que *vasa* maternel est stable jusqu'à 10-12 dpf (jour après fécondation), mais il est primordial pour la différenciation et la survie des cellules germinales à des stades plus tardifs (Hartung *et al.*, 2014).

3.2. Vasa

3.2.1. Marqueur des cellules germinales

Le gène *Vasa* code pour un type DDX4 d'hélicase RNA ATP-dépendante (Bachvarova *et al.*, 2009). Ce gène est très conservé au cours de l'évolution ; il a été caractérisé chez *D. melanogaster* par Hay *et al.* (1988) et de nombreux orthologues ont été retrouvés chez différentes espèces de Vertébrés, comme le gène *vas* chez *D. rerio* (Yoon *et al.*, 1997), *Xvlg-1* chez le xénope *Xenopus laevis* (Ikenishi *et al.*, 1996), *Cvh* chez le poulet *Gallus gallus* (Tsunekawa *et al.*, 2000) et *Mvh* chez la souris *M. musculus* (Toyooka *et al.*, 2000). Chez le tilapia du Nil, l'épissage alternatif donne deux formes d'ARNm de *Vasa*, une forme longue *vas* et une forme raccourcie dans la région 5'*vas-s*. Les formes *vas-s* et *vas* dominant respectivement dans les ovaires et dans les testicules (Kobayashi *et al.*, 2002).

Vasa a une fonction dans la structuration postérieure et dans la spécification des cellules germinales chez l'embryon (Gustafon *et al.*, 2011). Il participerait également au maintien de la totipotence cellulaire, en inhibant les gènes conduisant à la différenciation somatique (Raz, 2000), ce qui fait de lui l'un des déterminants majeurs de la lignée germinale. Durant la gonadogenèse, il est présent dans les testicules et les ovaires des vertébrés, au niveau des cellules germinales des deux sexes. *Vasa*, qui est essentiel pour le développement des CG, est souvent utilisé comme indicateur de ce processus (Raz, 2000). C'est un outil précieux pour mettre en évidence (protéine - immunohistochimie) ou bien étudier l'expression (transcrit - hybridation *in situ* et qPCR), mais il ne s'exprime que dans les CG à des stades précoces (spermatogonies, spermatocytes primaires). Il existe des animaux transgéniques *vasa*-GFP chez le poisson-zèbre et le médaka (Saito *et al.*, 2006), dont les CG sont rendues fluorescentes grâce au couplage avec la GFP, une protéine issue de la méduse. A ce jour il n'existe pas de lignée *vasa*-GFP chez le tilapia.

3.2.2. Exemple du tilapia du Nil

Chez les femelles, l'ovogenèse est initiée à 24-28 dpf, moment où la prolifération des ovogonies a lieu, et les premières cellules germinales méiotiques apparaissent vers 28-34 dpf (Baroiller, 1988 ; D'Cotta *et al.*, 2001a ; Nakamura *et al.*, 2013). A ces stades, une forte expression du transcrit *vasa* est observable, par hybridation *in situ*, dans le cytoplasme des ovogonies et des petits ovocytes. Par contre, *vasa* ne s'exprime pas dans les noyaux des CG quel que soit le stade considéré. Il y a une évolution du marquage *vasa* pendant l'ovogenèse. Des signaux forts sont visibles dans le cytoplasme des ovocytes précoces pré-vitellogéniques, ensuite comme la taille des ovocytes augmente, les signaux deviennent plus forts et peuvent occuper la totalité du cytoplasme. Par contre, ce signal devient moins visible dans les follicules vitellogéniques, probablement du fait de la dispersion de l'ARN de *vasa* dans le cytoplasme du follicule qui s'agrandit considérablement (Kobayashi *et al.*, 2010).

Chez les mâles, les cellules souches spermatogoniales et les spermatogonies de type A sont les seuls stades présents dans le testicule en différenciation. Aucune prolifération spermatogonale n'est observée avant 24-39 dpf (Baroiller, 1988 ; D'Cotta *et al.*, 2001a ; Nakamura *et al.*, 2013). A ces stades, le transcrit *vasa* est visible au niveau des spermatogonies. L'initiation de la spermatogénèse n'a lieu qu'après 54-74 dpf, au moment où apparaissent les méioses dans le testicule. Les cellules germinales mâles sont positives à *vasa* seulement dans les stades précoces, c'est-à-dire, du stade de spermatogonie A au spermatocyte primaire. Le signal est déjà beaucoup plus faible dans les spermatocytes primaires comparé aux spermatogonies et il est absent dans les spermatocytes au stade diplotène. *Vasa* n'est pas détecté dans les stades tardifs, des spermatocytes secondaires aux spermatozoïdes en passant par les spermatides (Kobayashi *et al.*, 2000).

3.3. Rôle des cellules germinales

3.3.1. Cas du poisson-zèbre

Chez cette espèce, le déterminisme du sexe est polygénique pour les souches domestiques, mais monogénique pour les souches sauvages (Wilson *et al.*, 2014), et l'environnement peut moduler les sex-ratios. C'est une espèce gonochorique où les individus ne changent pas de sexe à l'âge adulte, mais la particularité de ce poisson est qu'il présente une différenciation indirecte. Aux environs de 10 à 25 dpf, la gonade de tous les alevins possède des ovocytes à

des stades précoces. Ensuite, soit le développement femelle est maintenu (chez les futures femelles), soit il y a une transition vers un développement testiculaire avec une phase de pseudo-hermaphrodisme transitoire. L'élimination des CGP, lors des premiers jours du développement de la gonade provoque la réversion sexuelle de tous les individus génétiquement femelles en mâles phénotypiques stériles (Slanchev *et al.*, 2005). Ceci est confirmé par les résultats obtenus avec la lignée de mutants "*fancl*" (gène *Fanconi anemia*) ; les ovocytes précoces meurent peu après leur entrée en méiose, ce qui a pour conséquence d'induire la mise en place d'une configuration mâle dans les gonades stériles de ces mutants (Rodriguez-Mari *et al.*, 2010).

Chez cette espèce, la différenciation ovarienne semble donc dépendante d'interactions entre CG et cellules somatiques. En effet, les ovocytes produiraient un signal en direction des cellules somatiques pour promouvoir leur différenciation en cellules de la granulosa et de la thèque (Rodriguez-Mari *et al.*, 2005 ; Siegfried et Nusslein-Volhard, 2008). Ces cellules somatiques produiraient en retour les hormones sexuelles spécifiques jouant un rôle clé dans la détermination de caractères sexuels secondaires comme le comportement et la pigmentation. Ces CG semblent également requises chez l'adulte pour maintenir le phénotype femelle chez le poisson-zèbre (Dranow *et al.*, 2013). Lorsque la gonade est partiellement privée de ses cellules germinales (absence d'ovocytes, mais présence de cellules souches germinales) les femelles adultes s'inversent en mâles fertiles. Ceci indique que le signal, produit par les CG, agit sur les cellules somatiques pour promouvoir directement leur développement femelle ou indirectement *via* la répression de l'expression de gènes mâles.

Chez le poisson-zèbre, les CG sont donc indispensables non seulement pour induire le développement gonadique femelle, durant la différenciation sexuelle, mais aussi pour maintenir ce phénotype chez l'adulte (Dranow *et al.*, 2013).

3.3.2. Cas des mammifères

Si les CG ne semblent pas indispensables pour les premières étapes de la différenciation ovarienne, en particulier celle des cellules pré-granulosa et des cordons ovigères, en revanche, leur présence semble requise pour l'histogenèse folliculaire et la différenciation des cellules pré-granulosa en granulosa (Guigon et Magre, 2006). Au contraire, la perte des CG ne perturbe pas le développement testiculaire, bien qu'un retard dans l'organisation des tubes testiculaires ait été rapporté (McLaren, 1991).

Les CGs sont également indispensables pour promouvoir le développement ovarien complet chez les mammifères.

3.4. Interaction cellules germinales - somatiques

3.4.1. Cellules somatiques

Il existe deux types de cellules somatiques : les cellules de soutien aux cellules germinales et les cellules stromales. Les cellules de soutien sont les cellules de Sertoli pour les mâles et les cellules de la granulosa pour les femelles tandis que les cellules stromales sont les cellules de Leydig pour les mâles et les cellules de la thèque pour les femelles.

3.4.2. Interactions cellulaires

Cas du médaka

Comme chez le poisson-zèbre, les CG sont importantes pour la différenciation sexuelle chez le médaka et leur absence provoque la réversion sexuelle des femelles génétiques (XX). Chez les embryons dépourvus en CG (mutants morpholinos *cxc4*), les gonades se différencient en structures tubulaires qui expriment les gènes spécifiques "mâles", quelque soit le sexe génétique (XX ou XY) (Kurokawa *et al.*, 2007). Ces mutants ont aussi la particularité, à des stades précoces de la différenciation sexuelle, de ne pas réussir à maintenir les cellules de la granulosa (productrices d'œstrogènes) chez les femelles tandis que les cellules productrices d'androgènes ne sont pas touchées chez les mâles XY. Ceci a pour conséquence l'augmentation des taux d'androgènes et la diminution des niveaux d'œstrogènes chez ces mutants. Chez le médaka, la découverte de la mutation 'hotei' a permis de mettre en évidence que la voie de signalisation *amh/amhr2* contrôle la prolifération des CG (Morinaga *et al.*, 2007). Le signal de la répression de la prolifération des CG est régulé par la voie mâle et entraîne un développement testiculaire. En effet, Herpin *et al.* (2007) ont montré que le déterminant majeur du sexe *dmrt1bY* (exprimé dans les cellules somatiques entourant les CGPs avant la différenciation du sexe), inhibe la prolifération des CGP chez le médaka. Ces résultats suggèrent que les interactions entre les CG et les cellules somatiques sont primordiales pour le développement gonadique. Les cellules somatiques gonadiques sont prédisposées à un développement mâle en absence des CG tandis que les CG canalisent celles-ci vers un développement femelle grâce à un ou plusieurs signaux qu'elles leur

envoient, pour réprimer la prédisposition mâle de ces CG, mais également pour maintenir le statut femelle (Tanaka *et al.*, 2008).

Les interactions entre les CG et les cellules somatiques sont primordiales pour le développement gonadique chez le médaka.

Cas du poisson-zèbre

Le gène *fancl* est impliqué dans les processus de réparation de l'ADN, plus précisément la voie de signalisation 'Fanconi Anemia/BRCA'. Ce gène est exprimé dans les gonades bipotentielles, au niveau des cellules germinales en développement, à un moment critique du 'destin' de la détermination sexuelle (Rodriguez-Mari *et al.*, 2010). Il a été démontré que la protéine fancl est impliquée dans les réponses cellulaires induites par des stress, notamment les dommages causés à l'ADN et l'apoptose (mort cellulaire programmée). Une mutation pour le gène *fancl* chez le poisson-zèbre (lignée mutante *fancl*, Rodriguez-Mari *et al.*, 2010) induit une réversion sexuelle des femelles XX en mâles phénotypiques. Par immunohistochimie, il a été mis en évidence une augmentation du taux d'apoptose dans les cellules germinales des mutants *fancl*, ce qui compromet fortement la survie des ovocytes et explique l'altération de la transmission de signaux dérivés de ces ovocytes aux cellules somatiques pour maintenir le programme femelle. En effet, en l'absence d'ovocytes entrant en méiose, les cellules somatiques ne peuvent pas maintenir l'expression du gène ovarien *cyp19a1a* ni sous-exprimer le gène testiculaire *amh*. La conséquence est la masculinisation des gonades des mutants *fancl*. Produit par les ovocytes méiotiques, ce signal est essentiel aux précurseurs des cellules de la granulosa exprimant *cyp19a1a* pour se différencier en cellules matures de la granulosa.

Un signal des ovocytes méiotiques est indispensable pour la différenciation des précurseurs des cellules somatiques en cellules de la granulosa et promouvoir le développement femelle dans la gonade du poisson-zèbre.

Cas des mammifères

Manivannan *et al.* (2009) se sont intéressés aux mécanismes de contraception chez les rats mâles, après un traitement à long terme, par la fraction organique issue des graines de papaye. La substance a été administrée oralement à des rats adultes mâles, à une dose de 50 mg/kg de poids corporel, chaque jour pendant un an. Le mécanisme de contraception passe par la réduction du volume nucléaire et cytoplasmique des cellules spermatiques et une

dégénérescence nucléaire des spermatocytes et spermatides, reflet d'une spermatogenèse perturbée. Les cellules de Leydig présentent un aspect normal. Des effets initiaux ont été observés au niveau des cellules de Sertoli après 60 jours de traitement. Les spermatocytes et les spermatides sont affectés après 120-240 jours de traitement. Après 60 jours de traitement, une baisse significative de la viabilité des spermatozoïdes, une augmentation d'anomalies spermatiques, des niveaux de testostérone et 100% de stérilité sont constatés. Tous ces paramètres sont restaurés 120 jours après l'arrêt du traitement.

Le mécanisme de cette contraception passe par des effets sur la différenciation des spermatides dans le testicule, avec une probable implication de facteurs sécrétés par les cellules de Sertoli.

3.5. Apoptose des CG en réponse à un stress environnemental (température) ou chimique

3.5.1. Cas du poisson-zèbre

La mutation pour le gène *fancl* chez le poisson-zèbre (lignée mutante *fancl*, Rodriguez Mari *et al.*, 2010) engendre une réversion sexuelle des femelles XX en mâles phénotypiques par augmentation de l'apoptose des ovocytes, avant leur entrée en méiose. P53 est l'une des voies de signalisation impliquée dans les phénomènes d'apoptose. L'introduction d'une mutation tp53 chez des mutants *fancl* contrebalance la réversion sexuelle en diminuant l'apoptose des cellules germinales et les mutants XX deviennent des femelles fertiles.

La réversion sexuelle chez les mutants *fancl* de poisson-zèbre est causée par l'apoptose cellulaire contrôlée par la voie de signalisation p53 (Rodriguez-Mari *et al.*, 2010).

3.5.2. Cas du pejerrey

Ito *et al.* (2003) ont proposé de clarifier le processus histologique ainsi que les mécanismes de la disparition des cellules germinales par un traitement à la chaleur chez les alevins et les juvéniles du pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. La dégénérescence des cellules germinales, caractérisée histologiquement par des noyaux et des cytoplasmes éosinophiliques ou des noyaux pycnotiques, augmente avec les niveaux de températures élevées (29°C>24°C>17°C). Ceci est davantage visible chez les mâles que chez les femelles. Une perte complète des

cellules germinales est constatée uniquement chez des individus exposés à une température de 29°C pendant 8 à 12 semaines, mais le traitement ne produit pas 100% d'individus stériles. Une période de 84 jours à 29°C est nécessaire pour obtenir une perte significative de la fertilité des poissons (déficience sévère ou complète en cellules germinales). Les cellules germinales qui ont survécu à une exposition à 29°C ont la capacité de rapidement recoloniser les régions stériles de la gonade. Les cellules somatiques associées semblent peu ou pas affectées par les hautes températures. Par conséquent, les cellules somatiques seraient moins sensibles à la température que les cellules germinales chez le pejerrey, une caractéristique déjà observée dans les testicules des mammifères.

L'apoptose des cellules germinales semble être l'un des mécanismes induits par des températures stérilisantes, et ayant pour conséquence la déplétion en cellules germinales chez le pejerrey.

3.5.3. Cas des mammifères

L'apoptose des cellules germinales mâles a été considérablement explorée chez les rongeurs. Cependant, très peu de données sont connues sur les mécanismes d'apoptose des cellules germinales en réponse à un traitement au busulfan. Le busulfan est un diester sulfonique utilisé comme anticancéreux dans le conditionnement préalable à une greffe de cellules souches hématopoïétiques et administré par intraveineuse. L'apoptose spontanée des cellules germinales est rarement observée dans les testicules de souris adultes alors que des souris traitées au busulfan montrent une augmentation du taux d'apoptose et une diminution de leur poids testiculaire. Choi *et al.*, (2004) ont recherché les types cellulaires les plus sensibles à un stress induit par un traitement chimique au busulfan et les voies de signalisation impliquées, sur des souris mâles de 2-3 mois traités à une dose intra-péritonéale de 40 mg de busulfan/kg de poids vif. Quatre semaines après l'injection, le nombre de cellules germinales est significativement réduit chez les mâles traités ; la plupart des cellules spermatiques sont absentes. Le traitement ne semble pas affecter les caractéristiques des cellules somatiques incluant les cellules de Sertoli et de Leydig (localisation, forme et taille normales), mais réduit leur nombre. L'injection de busulfan augmente le pourcentage de cellules apoptotiques. Les cellules souches spermatogoniales se montrent plus résistantes à la toxicité du traitement que les cellules germinales spermatiques. En effet, cinq à six semaines après l'injection, le renouvellement des spermatogonies et spermatocytes dans les testicules traités résulte de la

prolifération puis différenciation des cellules souches spermatogoniales qui ont survécu. En analysant par RT-PCR l'expression de gènes marqueurs des différents types de cellules germinales mâles, les spermatogonies de type A et les spermatocytes au stade pachytène apparaissent comme plus sensibles à un traitement busulfan. L'apoptose provoque une dégénérescence spermatique ; les cellules germinales haploïdes ont complètement disparu ou sont mortes et la troisième vague d'apoptose induite implique une perte des spermatides post-méiotiques chez la souris (Choi *et al.*, 2004).

Chez les mammifères, un traitement busulfan induit l'apoptose cellulaire et les cellules souches spermatogoniales semblent être plus résistantes que les cellules germinales spermatiques.

P53, *Bax* et *FasL/Fas* sont impliqués dans les voies de l'apoptose des cellules germinales. Les synthèses protéiques de *Bax*, *p53* et *FasL/Fas* ne sont pas affectées par le traitement au busulfan. Cela suggère que l'apoptose des cellules germinales peut avoir lieu indépendamment de la voie *p53* et *FasL/Fas*. La phosphorylation de Rb (phosphoprotéine qui contrôle l'expression de gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire) et l'expression de PCNA (marqueur de prolifération cellulaire) sont inhibées dans les testicules traités au busulfan. La forme hypophosphorylée de p110Rb est associée en complexe au facteur de transcription cellulaire E2F. L'hypophosphorylation induite par le busulfan fait que p110Rb reste accroché à EF2, ce qui maintient EF2 dans sa forme inactive qui n'enclenche pas la transcription du gène PCNA. Le busulfan est aussi un inhibiteur spécifique des complexes cdk/cycline. Par cette voie, le busulfan pourrait empêcher la prolifération des cellules souches spermatogoniales en inhibant l'expression de protéines critiques de la progression du cycle cellulaire en phase G1, tel que le PCNA.

4. Facteurs externes influençant la différenciation et/ou la fertilité de la gonade

Chez des espèces d'amphibiens, de poissons et de reptiles, la différenciation gonadique peut également être influencée par des facteurs externes environnementaux comme la température, mais aussi les hormones exogènes.

4.1. Différenciation du sexe : masculinisation et féminisation

4.1.1. Stéroïdes sexuels chez les mammifères et les téléostéens

Voies de synthèse des androgènes et des œstrogènes

Les stéroïdes sexuels agissent comme des inducteurs artificiels de la différenciation sexuelle mâle ou femelle (Yamamoto, 1969 ; Baroiller *et al.*, 1999 ; Devlin et Nagahama, 2002). La stéroïdogénèse des vertébrés implique plusieurs enzymes et est réalisée en plusieurs étapes successives (**Figure 9**). A partir du cholestérol, intervient en premier le cytochrome P450_{scc} (P450 cholesterol side chain cleavage) qui va couper la chaîne latérale du cholestérol pour produire la prégnénolone. Puis la coupure de la chaîne latérale de la prégnénolone est assurée par la 3 β -hydroxysteroid-dehydrogenase (3 β HSD) et va donner la progestérone. Ensuite, le cytochrome P450_{c17} (17-hydroxylase/17,20-lyase) assure la conversion de la progestérone en 17-hydroxyprogestérone puis en androstènedione. Le troisième cytochrome, P450_{arom}, assure la conversion des androgènes en œstrogènes. De plus, chez les poissons, une enzyme synthétise les androgènes 11-oxygénés tels que la 11-kétostérone (11KT) à partir de l'androstènedione et de la testostérone, c'est la 11 β -hydroxylase (P450_{11 β}). La 11KT et l'E2 (œstradiol) ont été dosées par RIA (dosage radio-immunologique) dans des gonades monosexes mâles et femelles de 18-26 dpf (D'Cotta *et al.*, 2001a).

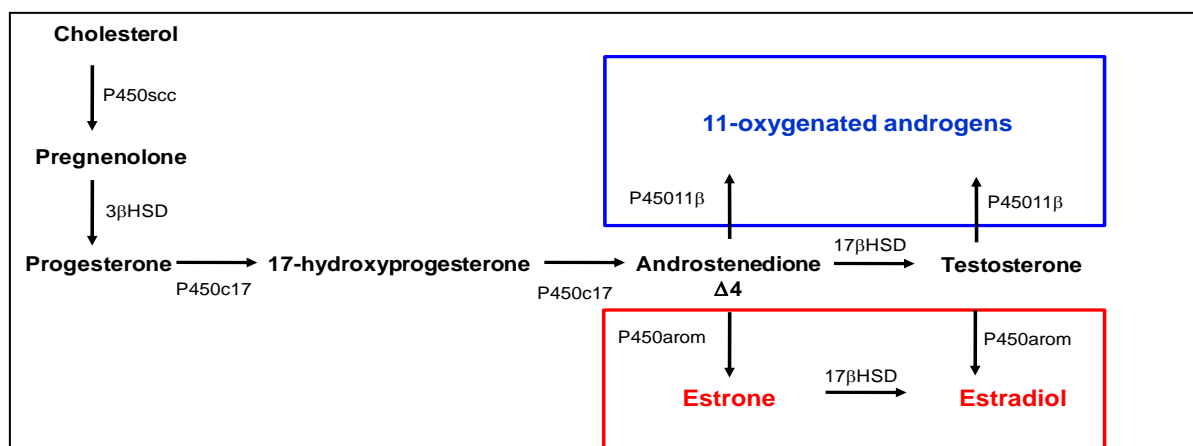


Figure 9. Représentation schématique des voies de synthèse des androgènes et des œstrogènes dans les gonades mâles et femelles des poissons téléostéens (d'après Baroiller *et al.*, 1999 ; Govoroun *et al.*, 2001).

Dans l'ovaire des femelles tilapias, comme chez les mammifères, la stéroïdogénèse est assurée par deux types de cellules stéroïdogènes, les cellules de la thèque interne et les cellules de la granulosa. Cependant, ces 2 types cellulaires diffèrent dans leur équipement enzymatique. En effet, les cellules de la granulosa ne possèdent pas le cytochrome P450c17. Elles ne peuvent donc pas synthétiser les androgènes précurseurs des œstrogènes, mais vont les importer des cellules thécales qui peuvent assurer la conversion du cholestérol en progestérone et testostérone. Les cellules de la granulosa sont le siège de l'aromatase des androgènes en œstrogènes (Devlin et Nagahama 2002). L'E2 peut être mesuré durant le développement gonadique chez le tilapia du Nil dans un pool de gonades prélevées de 18 à 27 dpf et, à cette période, les niveaux sont déjà élevés chez les femelles génétiques XX comparées aux mâles génétiques XY (D'Cotta *et al.*, 2001b). Les cellules de la thèque possèdent un récepteur à la LH qui stimule la conversion du cholestérol en prégnénolone et les cellules de la granulosa possèdent un récepteur de la FSH qui joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'activité aromatase (**Figure 10**).

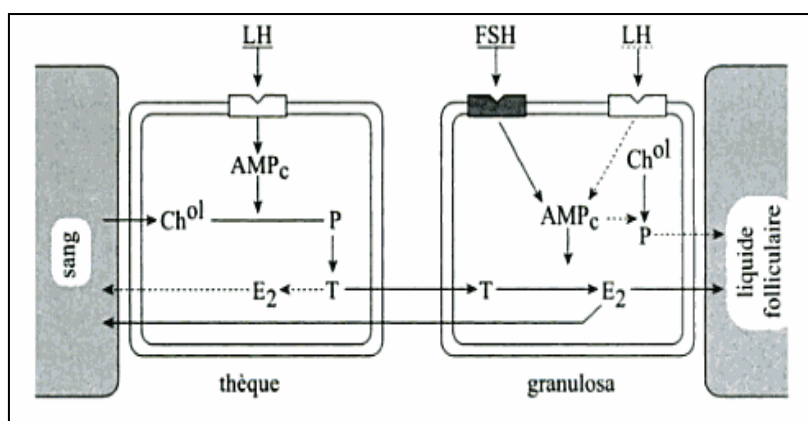


Figure 10. La stéroïdogénèse dans l'ovaire de mammifères (d'après Robel, 2001).

Induction d'une inversion sexuelle par les hormones stéroïdiennes appliquées chez les alevins, avant et pendant la différenciation sexuelle.

Le phénotype mâle peut être induit par des traitements aux androgènes ou par des inhibiteurs de l'aromatase tandis que des traitements par les œstrogènes provoquent la féminisation des gonades (Hunter et Donaldson 1983 ; Baroiller *et al.*, 1999). Les traitements hormonaux d'inversion sexuelle chez les poissons sont normalement appliqués au début de la prise alimentaire des alevins (à partir de 10 dpf pour le tilapia du Nil). Les traitements par balnéation à l'éclosion ou juste avant peuvent également être utilisés, mais nécessitent des doses extrêmement élevées et induisent d'importantes mortalités (Rougeot *et al.*, 2007).

Des traitements par des androgènes exogènes causent la masculinisation en inhibant l'expression des gènes *P450scc*, *3βHSD* et *cyp19a1* autour de 15 dpf chez le tilapia (Bhandari *et al.*, 2006) tandis que chez la truite arc-en-ciel, l'expression de *P450scc* n'est pas supprimée et *P45011β* est trouvé à de faibles niveaux (Govoroun *et al.*, 2001). Bien que les œstrogènes soient requis dans la différenciation sexuelle ovarienne naturelle et que leur absence engendre un développement testiculaire (Guiguen *et al.*, 1999), l'absence de stéroïdes, quant-à-elle, abouti quand même à un développement testiculaire. Ceci est confirmé par Nakamura *et al.*, (2003) et Golan et Levavi-Sivan (2014) qui confortent le fait que c'est l'absence d'œstrogènes et non la présence d'androgènes qui est essentielle au développement testiculaire naturel. Mais, malgré le fait que les androgènes ne semblent pas participer directement à la différenciation sexuelle naturelle, des androgènes synthétiques, principalement la 17-méthyltestostérone (MT) sont efficaces pour la production de descendance 100% mâles en aquaculture. Les mécanismes de cette inversion sexuelle sont mal connus. Cette faculté d'inversion sexuelle des androgènes synthétiques pourrait provenir soit de leur activité androgénique soit de leur action d'inhibition de l'aromatase. Golan et Levavi-Sivan (2014) ont démontré que l'administration de MT (androgène exogène), DHT (androgène non-aromatisable, dihydrotestostérone) et fadrozole (inhibiteur de l'aromatase) chez le tilapia, aboutissaient à une inversion sexuelle efficace. Par contre, l'utilisation d'un antagoniste aux récepteurs aux androgènes, la flutamide, contribue à une forte réduction de la puissance d'inversion sexuelle de ces trois composés. Dans le cas de la MT et de la DHT, la diminution de ce potentiel d'inversion sexuelle est probablement dûe au blocage direct de la liaison des androgènes à leurs récepteurs. Par contre, dans le cas du fadrozole, cette réduction d'efficacité du traitement peut être attribuée à un excès d'accumulation d'androgènes dans la gonade en différenciation, à cause de leur non-aromatisation en œstrogènes.

<p>Contrairement à ce qui est observé lors d'une différenciation testiculaire naturelle, ces résultats suggèrent que les androgènes endogènes ou exogènes participent également à la masculinisation de la gonade pendant des traitements d'inversion sexuelle.</p>

L'androgène le plus utilisé pour la réversion sexuelle du tilapia du Nil est le stéroïde synthétique 17α-méthyltestostérone (17MT), incorporé dans l'aliment à des doses de 50-60 mg/kg. Cette technique de masculinisation est utilisée dans la majorité des pays produisant du tilapia (Guerrero et Guerrero, 1988 ; Vera Cruz et Mair 1994 ; Mélard, 1995). D'autres

stéroïdes ont également été utilisés tels que l'androgène naturel 11 β -hydroxyandrostenedione (11 β OH Δ^4) appliqué à une dose optimale de 10-30 mg/kg chez le tilapia du Nil (Baroiller et Toguyeni, 1996) et à 50 mg/kg chez le tilapia rouge pendant 28 jours (Desprez *et al.*, 2003).

L'inhibiteur de l'aromatase, ATD (1,4,6-androstatriene-3-17-dione), à des doses de 150 mg/kg d'aliment, produit 75.3% de mâles dans les descendance monosexes femelles XX chez le tilapia du Nil (Guiguen *et al.*, 1999). Des sex-ratios supérieurs à 80% de mâles sont obtenus par des traitements au fadrozole à une dose de 500 mg/kg d'aliment chez des descendance monosexes femelles de tilapias (Kwon *et al.*, 2000). La masculinisation par inhibition de l'aromatase a aussi été rapportée chez plusieurs espèces de téléostéens comme la truite arc-en-ciel (Guiguen *et al.*, 1999), le poisson-zèbre (McAllister et Kime, 2003 ; Fenske et Segner 2004), le fugu *Takifugu rubripes* (Rashid *et al.*, 2007) et la carpe commune *Cyprinus carpio* (Tzchori *et al.*, 2004).

L'œstradiol-17 β (E2) cause la réversion sexuelle des mâles XY tilapias du Nil en phénotypes femelles XY, mais n'a que très rarement une efficacité de 100%. Le traitement doit être appliqué à partir de 8-9 dpf à une dose de 150 mg/kg d'aliment chez le tilapia du Nil. Cette dose est beaucoup plus élevée que celle utilisée lors des traitements de masculinisation par les androgènes, appliqués à 10 dpf (Baroiller et Jalabert, 1989 ; D'Cotta *et al.*, 2001a). Il en est de même chez le pleurodèle chez lequel un traitement au benzoate d'œstradiol dans l'eau d'élevage (100 μ g/L) engendre une inversion sexuelle des individus du sexe homogamétique (mâles ZZ) en néo-femelles fertiles ZZ (Gallien et Durocher, 1957). L'importance des œstrogènes comme inducteurs de la différenciation ovarienne a été montrée à travers des études d'inhibition de l'aromatase, l'enzyme qui catalyse la conversion des androgènes en œstrogènes (Baroiller *et al.*, 1999). Le blocage de l'activité aromatase engendre la masculinisation des individus génétiquement femelles XX (Baroiller *et al.*, 1999).

Ces différentes études indiquent que l'inhibition de l'activité aromatase conduit à des niveaux élevés d'androgènes, dû à leur non-aromatisation. Le ratio androgènes/œstrogènes permet la différenciation testiculaire tandis que des niveaux élevés d'E2 conduisent à un développement ovarien (**Figure 11**) (Baroiller *et al.*, 1999 ; Govoroun *et al.*, 2001 ; Nakamura *et al.*, 2003 ; Bhandari *et al.*, 2006 ; Guiguen *et al.*, 2009).

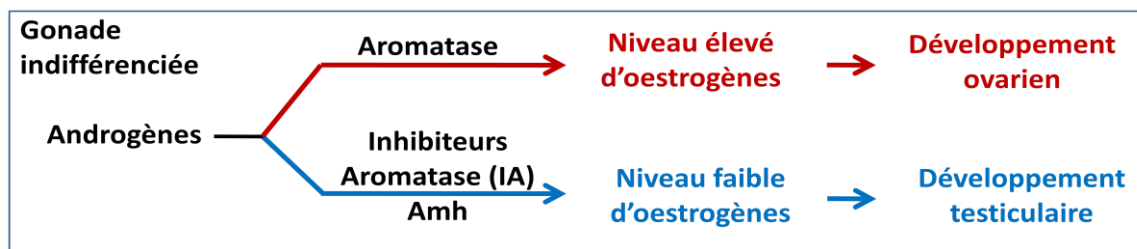


Figure 11. Les niveaux d'oestrogènes sont responsables du développement gonadique mâle ou femelle (modifié de Guiguen *et al.*, 2009).

Induction d'une inversion sexuelle par des inhibiteurs de l'aromatase, appliqués chez les adultes, après la maturation sexuelle.

L'inversion sexuelle des femelles génétiques en mâles phénotypiques, par des traitements aux androgènes ou des inhibiteurs de l'aromatase avant la différenciation sexuelle, a déjà été rapportée de nombreuses reprises et chez de nombreuses espèces. Il est également possible d'inverser le sexe chez des adultes après la maturation sexuelle, chez deux espèces gonochoriques, le tilapia du Nil et le médaka.

Cas du tilapia du Nil

Récemment, Sun *et al.* (2014) ont démontré que des femelles juvéniles tilapias, âgées de 90 94 dpf et présentant des ovaires différenciés, peuvent être masculinisées *via* un traitement de longue durée par l'inhibiteur de l'aromatase (IA), fadrozole (200 µg/g aliment). En effet, 90 jours de traitement sont nécessaires pour obtenir un effet optimal (30 jrs = 0% de réversion et 60 jrs = 11% de réversion). Les auteurs ont qualifié ce phénomène d'inversion sexuelle secondaire (SSR) ou trans-différenciation et celle-ci peut être contrée par l'ajout d'œstradiol 17β exogène (200 µg/g aliment). Les résultats de l'analyse de cette SSR suggèrent que les spermatogonies sont issues de la transformation des ovogonies ou des cellules germinales souches distribuées dans l'épithélium germinale. Les cellules de Leydig proviendraient probablement des cellules interstitielles ovariennes et les cellules de Sertoli des cellules de la granulosa de l'ovaire. Une analyse détaillée indique que cette trans-différenciation est induite par l'inhibition de l'aromatase. Ces résultats sont en accord avec les travaux publiés la même année par Paul-Prasanth *et al.* (2013) ; des femelles tilapias reproductrices âgées d'un an, exposées à une dose de 200 µg/g de fadrozole pendant six mois ont été inversées sexuellement. Cette inversion sexuelle a touché la totalité ou une partie de la gonade, comme

en atteste la présence de petits cystes spermatogoniaux à 3 mois de traitement, puis l'apparition de sperme et des canaux spermatiques à 6 mois de traitement. Elle touche également le cerveau par l'apparition de caractères secondaires mâles chez les individus XX inversés. Dans la présente étude, la dégénérescence des cellules germinales femelles est suivie par la mise en place du tissu testiculaire. Les cellules germinales spermatiques apparaissent tout d'abord dans la portion postéro-ventrale, à l'opposé des vaisseaux sanguins et de la cavité ovarienne, qui persistera au centre de la gonade. Comme démontré par Sun *et al.* (2014), les ovaires des femelles traitées par le fadrozole se sont transformées en testicules fonctionnels, avec présence de sperme et les cellules interstitielles ont une activité stéroïdogénique (positives pour deux enzymes de la stéroïdogénèse : SCC et 3 β -HSD). De plus, cette transdifférenciation résulte à la fois de l'inhibition des gènes de la voie femelle et de l'activation de ceux de la voie mâle, ce qui a pour conséquence l'effondrement du taux d'E2 dans le plasma des animaux traités par l'IA.

Cas du médaka

Des femelles matures de médakas de 5 mois subissent également une inversion sexuelle, suite à un traitement par IA (exemestane) à une dose de 100 μ g/g pendant deux mois (Paul-Prasanth *et al.*, 2013). Contrairement au tilapia, un traitement par IA de deux mois a été suffisant pour inverser complètement les gonades de certaines femelles adultes chez le médaka. Chez les individus IA, il a été démontré que les spermatogonies et les cellules de Sertoli proviennent des cystes de la lignée germinale situés le long de l'épithélium germinale. La déplétion en E2, visible chez les IA, a induit un phénotype mâle dans la gonade des femelles génétiques adultes ; l'E2 est donc indispensable au maintien du phénotype femelle gonadique. Ces observations vont dans le sens d'un rôle critique des hormones stéroïdiennes dans la régulation du développement des CSG (cellules souches germinales) et des cellules somatiques autour d'elles, dans les ovaires des femelles adultes.

Les poissons gonochoriques maintiennent leur plasticité sexuelle jusqu'à l'âge adulte et les œstrogènes jouent un rôle critique dans le maintien du phénotype femelle.
--

4.1.2. La température

La température est le facteur environnemental le plus connu pour influencer la différenciation sexuelle (Baroiller *et al.*, 1999) et selon Devlin et Nagahama (2002), les fluctuations de température, dans le milieu naturel, pourraient altérer les voies biochimiques de la détermination sexuelle des poissons et induire le développement mâle ou femelle.

Chez les mammifères

Fsh (follicle stimulating hormone) stimule la synthèse des œstrogènes par régulation de l'expression du gène de l'aromatase chez les mammifères (Dorrington *et al.*, 1975 ; Fitzpatrick *et al.*, 1991). Shimizu *et al.* (2005) ont démontré qu'un stress dû à la chaleur inhibe l'expression du récepteur à la *Fsh* (*Fshr*) dans les cellules de la granulosa provoquant une réduction de l'activité de l'aromatase.

Chez les poissons

Les hautes températures suppriment l'expression de *foxl2* et de *fshr* durant le développement sexuel précoce de l'hirame, *Paralichthys olivaceus*. Un stress reposant sur de fortes températures provoque également la suppression de la synthèse des œstrogènes par inhibition de l'expression de *fshr* dans la gonade des femelles génétiques XX chez cette espèce durant les stades de la différenciation du sexe. Ceci résulte en une inversion sexuelle (Yamaguchi *et al.*, 2007). Chez le poisson-zèbre, des descendances femelles génétiques XX élevées de 15 à 25 dpf, à des températures de 35 et 37°C, ont un pourcentage de masculinisation de respectivement 68.8 et 100%. Ceci implique que les hautes températures engendrent également une inversion sexuelle des femelles XX en individus phénotypiquement mâles. Il a aussi été démontré que les effets de ces fortes températures passaient par l'induction de l'apoptose des ovocytes, la suppression de l'activité P450arom et la différenciation des spermatogonies (Uchida *et al.*, 2004).

La température influence également l'expression de *cyp19a1a* durant la différenciation sexuelle du tilapia (D'Cotta *et al.*, 2001a). A des températures normales, des niveaux élevés de l'expression de *cyp19a1a* sont trouvés dans les gonades des femelles génétiques XX. Par contre, des températures masculinisantes >32°C, causent l'inversion sexuelle de ces femelles génétiques XX en mâles phénotypiques par répression de l'expression du gène *cyp19a1a* (**Figure 12**). Ce point sera développé dans la sous-partie 5.

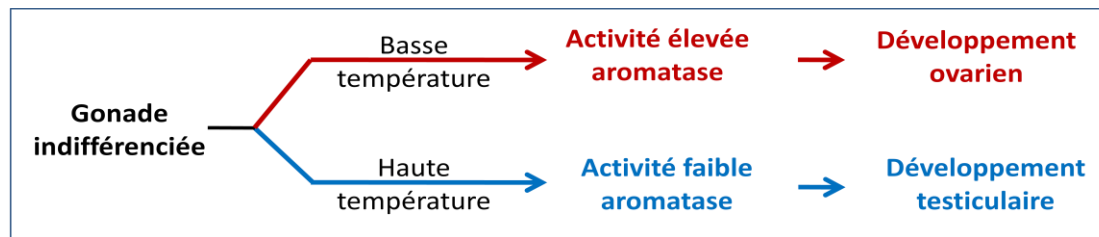


Figure 12. Chez les espèces thermosensibles et/ou à déterminisme TSD (Temperature Sex Determination), les niveaux d'aromatase gonadique sont également régulés par la température durant la période critique (d'après D'Cotta *et al.*, 2001a).

4.2. La fertilité/stérilité

4.2.1. Les méthodes de stérilisation utilisées en aquaculture

Les manipulations génétiques : la triploïdisation.

Les manipulations génétiques par triploïdisation sont utilisées chez de nombreuses espèces d'intérêt aquacole pour produire des poissons stériles. Le succès de cette stérilité va dépendre de plusieurs facteurs : le sexe, l'espèce choisie, la méthode de traitement employée et la qualité des œufs qui seront utilisés.

La triploïdie repose sur l'utilisation de chocs thermiques (chauds ou froids) ou hyperbares (pression) qui, en empêchant l'expulsion du 2^{ème} globule polaire lors de la seconde division méiotique, permettent de doubler la contribution génétique nucléaire d'origine maternelle (2n). Le spermatozoïde, quant à lui, apporte le 3^{ème} "stock" (n), pour obtenir un individu 3n (**Figure 13**). Cette technique est utilisée depuis très longtemps pour produire des poissons 'stériles' en particulier chez les salmonidés.

La triploïdisation est aujourd'hui la technique considérée comme la plus pratique, la plus économique et la plus efficace pour la production de poissons stériles à grande échelle (Maxime 2008). Néanmoins, ce traitement peut induire une forte mortalité chez beaucoup d'espèces. Par ailleurs, la stérilité fonctionnelle de 100% des individus traités (existence possible de mosaïcisme 2n/3n chez les salmonidés ainsi traités) est discutée chez les poissons, en particulier pour les mâles. Par ailleurs, certaines espèces de poissons naturellement triploïdes, sont capables de se reproduire. L'absence de risque lié à l'échappement de triploïdes (3n) dans le milieu naturel ne peut donc pas être totalement garanti (Pandian et Koteeswaran 1998 ; Devlin et Nagahama, 2002 ; Linhart *et al.*, 2006 ; Maxime, 2008 ; Piferrer *et al.*, 2009). Chez la carpe herbivore, *Ctenopharyngodon idella*, des

individus stériles triploïdes ($3n$) sont utilisés aux USA pour contrôler la prolifération des mauvaises herbes dans le milieu naturel. C'est pourquoi, les descendances sont préalablement vérifiées avec un compteur Coulter afin de s'assurer que les poissons lâchés dans le milieu naturel sont effectivement tous stériles. En effet, la carpe herbivore est ici une espèce exotique et pourrait constituer une menace pour les espèces endémiques. Ceci pourrait théoriquement être appliqué dans d'autres programmes de pisciculture.

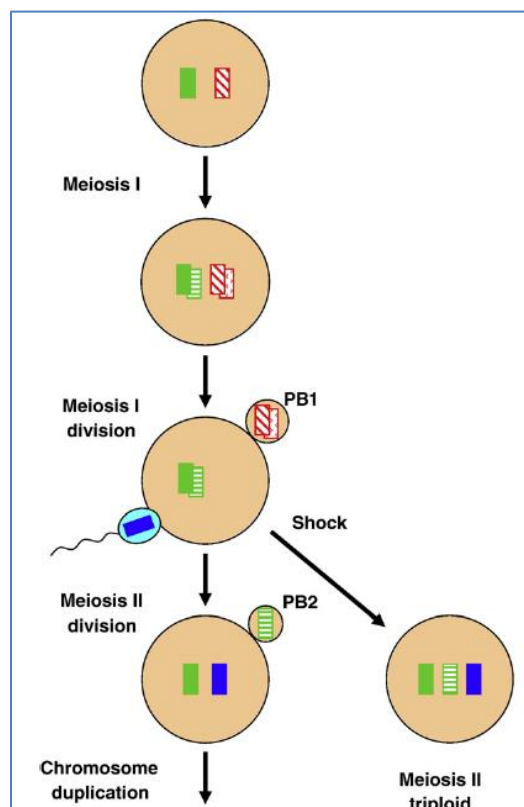


Figure 13. Production d'individus triploïdes $3n$ (d'après Piferrer *et al.*, 2009).

Par ailleurs, une partie des consommateurs reste inquiète sur les approches de manipulations chromosomiques, assimilant faussement les triploïdes à des organismes génétiquement modifiés (OGM), alors qu'ils ne sont pas officiellement considérés comme tels par les réglementations européennes (UE, directive 90 / 220 / CEE). Enfin, la mise en œuvre de tels traitements de manipulation chromosomique par chocs de pression est difficilement envisageable sur des espèces dont la reproduction en élevage est semi-naturelle (tilapia) ou chez des petits pisciculteurs de pays du sud.

Une alternative à la triploïdisation présente donc un intérêt fort pour beaucoup d'espèces d'aquaculture. Les traitements chimiques, tels que l'utilisation de fortes doses de méthyltestostérone, de busulfan ou encore d'extraits de graine de papaye, peuvent induire une stérilité chez les poissons. Les résultats de ces traitements sont encourageants en ce qui concerne leur efficacité, mais soulèvent de nombreuses questions en matière d'impacts possibles sur le consommateur et/ou sur l'environnement.

4.2.2. Méthodes de stérilisation envisagées en aquaculture

Approche écologique : les températures stérilisantes.

Sous réserve de l'optimisation des traitements (en particulier au niveau du taux de mortalité engendré) et de la vérification que celui-ci n'affecte pas négativement d'autres caractères d'intérêt (survie, croissance, résistance aux pathogènes), une approche environnementale constituerait une technique de choix pour la production de poissons stériles en aquaculture. Par ailleurs, l'étude de l'effet des températures élevées sur la reproduction au sens large (différenciation du sexe, fertilité...) des organismes aquatiques, et en particulier des poissons, est un sujet d'actualité, en lien avec le changement climatique (scénario de réchauffement des eaux). En effet, le climat pourrait avoir un fort impact sur certaines espèces de poissons sensibles à la température comme le pejerrey, *Odonthestes bonariensis* (Ito *et al.*, 2008). Comme déjà démontré chez certains mammifères, les hautes températures peuvent induire une stérilisation de la gonade par apoptose des cellules germinales, au moins chez certaines espèces de poissons. En effet, les chocs chauds peuvent induire une dégénérescence gonadique, *via* le phénomène d'apoptose¹ des CG chez la souris adulte (Yin *et al.*, 1997), mais aussi chez plusieurs espèces de poissons comme le pejerrey (Strüßmann *et al.*, 1998 ; Ito *et al.*, 2008a et b ; Madjhi *et al.*, 2009), le tilapia (Nakamura et Nagahama, 1995 ; Baroiller et Clota, 1998), le poisson zèbre (Uchida *et al.*, 2004) et le fugu (Lee *et al.*, 2009). Chez le pejerrey (Strüßman *et al.*, 1998 ; Strüßman et Patino, 1999 ; Ito *et al.*, 2008a et b ; Madji *et al.*, 2009), comme chez le tilapia (Nakamura *et al.*, 1995 ; Baroiller et Clota, 1998), des gonades stériles ont été trouvées chez quelques individus traités à fortes températures.

¹encore appelée mort programmée, l'apoptose est le processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire.

Cependant, il convient de vérifier si cette stérilité induite est totale et non réversible après l'arrêt du traitement. Par ailleurs, les mécanismes impliqués dans un tel effet ne sont pas encore bien connus.

Cas du pejerrey

Strüssman *et al.*, (1998) ont relaté l'induction expérimentale de la disparition des cellules germinales chez deux espèces de poissons téléostéens, *Odontesthes bonariensis* et *Patagonia hatcheri*, par une exposition à de hautes températures durant la gonadogenèse précoce. Ils ont mis en évidence que les cellules germinales du pejerrey sont sensibles à la chaleur qu'elles se trouvent dans un environnement gonadique femelle (développement ovarien de la gonade) ou mâle (testicule). L'examen microscopique révèle des gonades avec une déficience complète ou partielle en cellules germinales, quel que soit le sexe de l'individu considéré et chez les deux espèces. Par conséquent, la chaleur induit une déplétion des cellules germinales au moins chez ces deux espèces de poissons, mais contrairement aux mammifères, cet effet est constaté chez les mâles comme chez les femelles. De fait, l'exposition d'alevins et de juvéniles de pejerrey à une température de 29°C, sur de courtes périodes, cause une masculinisation fonctionnelle des individus génétiquement femelles (Strüssman et Patino 1995 ; Strüssman *et al.*, 1997) et la perte des cellules germinales lors de longues périodes d'exposition (Strüssman et Patino, 1999 ; Strüssman *et al.*, 1998). Effectivement, des juvéniles de pejerrey traités à 29°C pendant 90 à 130 jours ont des gonades très pauvres en cellules germinales, voire totalement stériles. Des études préliminaires ont mis en évidence que la mort des cellules germinales survenait peu de temps après le début de l'exposition des individus à cette température. Cependant, le mécanisme en jeu ainsi que la durée du traitement nécessaire à une telle stérilité demeurent mal connus. Des interrogations subsistent également quant à la réversibilité ou la pérennité des dommages causés dans la gonade (Ito *et al.*, 2003).

Cas du Pufferfish, Takifugu rubripes

Il a été démontré que des traitements à de fortes températures (32°C) n'influencent pas la différenciation sexuelle de cette espèce (Lee *et al.*, 2009), contrairement à ce qui a déjà été rapporté, dans la littérature, sur d'autres espèces de poissons (Baroiller *et al.*, 1999 ; Baroiller et D'Cotta *et al.*, 2001a ; D'Cotta *et al.*, 2001b), de reptiles (Pieau *et al.*, 1999 ; Modi et Crews, 2005), et d'amphibiens. Lee *et al.* (2009) ont cependant trouvé que :

- 1) un traitement à forte température accélère la croissance et le développement gonadique

quand il est administré à des stades précoces ; 2) une dégénérescence gonadique, avec une déplétion en cellules germinales, a lieu chez les 2 sexes à 32°C TP. Ceci est confirmé par la non expression du gène vasa (marqueur des cellules germinales) dans les testicules et les ovaires anormaux alors qu'il est exprimé dans les gonades normales. Ces résultats ont été analysés histologiquement par hybridation *in situ*, mais aussi au niveau moléculaire en RT-PCR ; et 3) à 32°C, *dmrt1* est exprimé dans les cellules somatiques des ovaires dépourvus de cellules germinales (démontré en hybridation *in situ* et RT-PCR) alors que Yamaguchi *et al.* (2007) ont démontré que *dmrt1* est exclusivement exprimé dans les testicules par les cellules de Sertoli et qu'il est absent des ovaires chez le Pufferfish. Ces résultats suggèrent qu'un traitement à forte température induit l'expression de *dmrt1* dans les cellules somatiques des ovaires dépourvus de cellules germinales.

Une plante médicinale: la graine de papaye *Carica papaya*

Les plantes médicinales ont déjà été utilisées avec succès pour induire la stérilité d'animaux de laboratoire (Gary et Garg, 1971 ; Bodharkar *et al.*, 1974 ; Das, 1980). La graine de papaye administrée oralement à des rats albinos mâles contrôle leur reproduction (Udoh et Kehinde, 1999). Elles contiennent des molécules actives comme la caricacine (une enzyme), la carpasemine (un inhibiteur de croissance des plantes) et des glycosides oléaniques, reconnus pour causer la stérilité chez les rats mâles (Das, 1980). L'efficacité du contrôle de la reproduction chez le rat par les graines de papaye, à court-terme, a déjà été établie de nombreuses fois dans la littérature (Gary et Garg, 1971 ; Das, 1980 ; Udoh et Kelinde, 1999). Une stérilité partielle ou totale, selon la dose administrée, faible ou forte, est observée chez des rats albinos mâles (Manivannan *et al.*, 2009).

4.2.3. Méthodes efficaces, mais non autorisées en aquaculture

Transgénèse

Chez les vertébrés, la fonction de reproduction est contrôlée dans le cerveau par l'axe hypothalamo-hypophysaire. La GnRH (gonadotropin-releasing hormone) est synthétisée par l'hypothalamus et stimule la libération des GtHs (gonadotropines), FSH (follicle stimulating hormone) et LH (luteinizing hormone), au niveau de l'hypophyse. Celles-ci stimulent à leur tour la production, par les gonades, des stéroïdes sexuels qui interviennent dans la différenciation et la maturation gonadique. La défaillance d'un de ces acteurs altère cet axe et va avoir pour conséquence une perturbation plus ou moins importante de la reproduction.

Les méthodes transgéniques perturbent la fonction endocrinienne de la reproduction et induisent une stérilité en altérant des gènes codant pour des hormones indispensables à la reproduction (GnRH, LH, FSH ...). Par contre cette stérilité est réversible et la fertilité des individus est restaurée après administration exogène de l'hormone qui fait défaut (Tomy et Poniah, 2014). Deux méthodes sont employées pour altérer la fonction génique : "gene knockout", par ciblage de la séquence génique (ADN) et "gene knockdown", par ciblage de son messenger spécifique (ARN). Ce ciblage repose sur l'élimination d'une partie de la séquence du gène cible et son remplacement par une copie tronquée, *via* une recombinaison homologue.

Une technique à la fois intéressante et astucieuse est le "gene knock down par antisens". Il s'agit d'insérer, en orientation inverse, la séquence du gène cible dans une construction transgénique afin de transcrire un ARN complémentaire qui se liera au transcrit ARN cible, provoquant ainsi la baisse du niveau d'expression du gène cible. La première espèce de poisson chez qui cette approche a été réalisée, pour induire une stérilisation, est la truite arc-en-ciel, en générant une construction transgénique "GnRH3 gene antisens". Ceci a abouti à une maturation asynchrone des individus ayant l'antisens (Tomy et Poniah, 2014).

Très récemment, une approche morpholino antisens (MO) dirigée contre le gène *dead end* (*dnd*), qui code une protéine de liaison à l'ARN cruciale pour la migration et la survie des CGPs chez les vertébrés a été utilisée avec succès pour stériliser le sterlet, un esturgeon eurasiens, *Acipenser ruthenus* (Linhartova *et al.*, 2015). Cette technique consiste à appairer un MO sur un site cible d'un ARN, généralement au niveau de la région d'initiation de la traduction, afin de bloquer l'accès du site de liaison de cet ARN à d'autres molécules, empêchant ainsi sa traduction.

Une molécule chimique le busulfan.

Cette molécule a été utilisée chez de nombreuses espèces de mammifères, reptiles, amphibiens et poissons afin d'éliminer les CG et ainsi pouvoir étudier leur rôle et importance au sein de la gonade. En effet, beaucoup d'études, réalisées chez de nombreux vertébrés, ont examiné le développement des gonades après déplétion des CG, afin notamment de visualiser une potentielle inversion sexuelle. Chez ces espèces, le busulfan a été utilisé par injection péritonéale. Dans mes travaux de thèse, nous avons décidé de l'expérimenter en l'incorporant dans l'aliment.

Chez les amphibiens, Piprek *et al.* (2012) ont montré qu'un traitement au busulfan détruit partiellement les CG mais peut aussi affecter les cellules somatiques, ce qui provoque un retard de croissance larvaire, une réduction du poids des gonades, et une tendance à la dégénérescence gonadique et à la métamorphose. La taille réduite des gonades est le résultat de la suppression des CG, similairement au syndrome Del Castillo² chez l'humain, mais l'ablation des CG n'engendre pas une réversion sexuelle complète chez les amphibiens. En effet, aucun signe de développement testiculaire n'est observable chez les femelles anoures dépourvues de CG. La présence des CG ne semble donc pas être indispensable pour le développement ovarien chez les anoures. Il en est de même chez des reptiles, comme la tortue de Floride, pour lesquels cette déplétion par un traitement au busulfan, n'altère pas le sexe des gonades (DiNapoli et Capel, 2007). En effet, les testicules dépourvus en CG des mâles traités au busulfan possèdent des cordons testiculaires (donnant les futurs tubes séminifères) morphologiquement normaux, mais une hyper-prolifération des cellules de Sertoli est observée. La morphologie des ovaires provenant des femelles traitées n'est pas altérée en absence de CG. Par contre, la taille du domaine cortical de la gonade est réduite ce qui est due à l'absence des CG et non à celle des cellules somatiques. Cette analyse suggère que les CG ne sont pas requises chez cette espèce de tortue pour établir la morphologie de la gonade mâle ou femelle. Chez des oiseaux comme la caille *Coturnix coturnix*, l'ablation des CG ne provoque pas non plus de réversion sexuelle (Hallett et Wentworth, 1991).

Le phénomène de réversion sexuelle femelle en mâle est observé chez des mammifères stériles. Une perte des CG est associée à un échec de la formation des follicules ovariens et à une perturbation complète de la morphologie de l'ovaire après la naissance chez les mammifères (Guignon *et al.*, 2005). Dans ce cas, les précurseurs des cellules folliculaires ovariennes se trans-différencient en clusters de cellules de Sertoli qui forment des structures ressemblant à des cordons testiculaires (Tanaka *et al.*, 2001 ; Uchida *et al.*, 2002). Chez les mammifères, les CG jouent un rôle primordial dans la différenciation et le développement

²encore nommé "Sertoli cell-only syndrome" ou "aplasie des cellules germinales". Ce syndrome est rencontré chez l'homme. Les patients mâles présentent une stérilité, sans anomalies sexuelles ; ils ont les caractères sexuels secondaires mâles, mais de petits testicules. La biopsie testiculaire révèle une spermatogenèse absente ou très réduite (azoospermie), en dépit de la présence des cellules de Sertoli dans les tubes séminifères, et des cellules de Leydig dans le tissu interstitiel.

précoce de l'ovaire (McLaren et Southee, 1997). En effet, des traitements d'ablation des CG, comme le busulfan, empêchent la formation de follicules. Par contre, le développement testiculaire n'est pas affecté par l'absence des CG et bien que des retards dans l'organisation des cordes testiculaires aient été rapportés, des tubes séminifères stériles sont formés normalement. Chez le poisson-zèbre, l'ablation des CG provoque une inversion sexuelle des gonades femelles en testicules (Schutt et Nothinger, 2000). Il en est de même chez les poissons-zèbres adultes (Slanchev *et al.*, 2005). Les CGs sont donc indispensables au maintien de la voie femelle dans les ovaires et à la répression de la voie mâle.

5. Présentation de la thèse

5.1. Modèle biologique : le tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus*

5.1.1. Taxonomie

Le groupe des tilapias comprend 77 espèces (van den Audenaerde, 1968). Il appartient au super ordre des poissons téléostéens et à la famille des Cichlidés (George, 1997). Le tilapia du Nil est originaire d'Afrique. Son aire de répartition naturelle recouvre l'ensemble de la province nilo-soudanienne, la province éthiopienne de la vallée du grand rift est-africain, celle du Kivu, celle du nord du Tanganyika (Ruzizi) ainsi que le nord de la vallée du rift est-africain (Bezault *et al.*, 2011). Plusieurs espèces de tilapia utilisées en aquaculture ont été introduites dans de nombreuses régions du monde tropicales, subtropicales et même tempérées durant la seconde moitié du 20^{ème} siècle (Pillay, 1990). Du fait de ces introductions et de ses impressionnantes capacités d'adaptation à de nombreux milieux, le tilapia est aujourd'hui élevé dans plus de 100 pays. Le genre *Tilapia* a été décrit pour la première fois par Smith (1840). Sa classification repose en particulier sur son comportement de reproduction et parental, et ses régimes alimentaires. Trois genres sont ainsi distingués (Nelson, 2006) : *Oreochromis*, *Tilapia* et *Sarotherodon*. Le genre *Oreochromis* se caractérise par une incubation buccale exclusivement maternelle des œufs et alevins. Dans le genre *Sarotherodon*, la descendance est incubée soit exclusivement par le mâle, soit par les deux parents. Enfin, le comportement parental est un peu moins élaboré dans le genre *Tilapia* qui est un pondeur sur substrat, dont les œufs collants, sont fixés dans un nid et protégés par les deux parents qui ventilent ces œufs par des mouvements réguliers de nageoire caudale (Baroiller et Jalabert, 1989 ; Baroiller et Toguyeni, 2004). Seconde production piscicole

mondiale, le tilapia est souvent qualifié de «poulet aquatique», tant il est devenu un produit de consommation courante dans de nombreux pays, en particulier du Sud. Trois espèces font aujourd'hui l'objet d'élevages à une échelle significative : *O. niloticus*, *O. aureus*, *O. mossambicus* ainsi que leurs hybrides. Ma thèse porte sur le modèle *O. niloticus*, plus communément appelé tilapia du Nil.

5.1.2. Biologie

Comportement de reproduction

Les tilapias sont des espèces de poissons gonochoriques. Ils atteignent leur maturité sexuelle très précocement, dès 4-5 mois dans certaines conditions. Le tilapia du Nil élabore un comportement de parade associé à des patrons de colorations spécifique des 2 parents : le mâle devient noir au niveau de la nageoire caudale tandis que la femelle présente des stries sur ses flancs. Le mâle établit un territoire en creusant un cratère en guise de nid et garde son territoire. Ce nid sera ensuite utilisé par la femelle pour y déposer ses œufs, lesquels vont ensuite être fertilisés par le mâle. Immédiatement après, la femelle va collecter les œufs dans sa bouche et monter vers les eaux peu profondes où elle va les incuber en les faisant tourner continuellement dans sa cavité buccale. L'éclosion a lieu environ 4 jours plus tard dans la bouche de la femelle et la vésicule vitelline met ensuite 4 à 5 jours à se résorber (**Figure 14**). Dès lors, les larves sont capables de se nourrir et s'échappent de la bouche de la femelle. Après leur libération, les alevins reviennent se cacher dans la bouche de leur mère au moindre danger ainsi que toutes les nuits pendant une à deux semaines (Baroiller et Jalabert, 1989). Bezault *et al.* (2007) ont montré que, quand la fratrie naissait dans le milieu sauvage, les alevins restaient dans la journée dans des eaux très peu profondes où les températures peuvent dépasser les 32°C (seuil à partir duquel les températures deviennent masculinisantes en milieu contrôlé). Le nombre d'œufs par ponte est proportionnel au poids corporel de la femelle : une femelle de 200g peut produire de 400 à plus de 2000 œufs. Une femelle élevée dans de bonnes conditions, à une température de 25 à 28°C, peut se reproduire en moyenne tous les 27 jours si elle incube ses pontes ou tous les 15 jours si on lui retire ses œufs de la bouche à chaque nouvelle reproduction (Tacon *et al.*, 2000). Pendant les phases d'incubation buccale et de protection des larves, les femelles ne se nourrissent pas. Leur croissance est donc plus faible que celle des mâles (Baroiller *et al.*, 2014). A des températures inférieures à 22-24°C, la production d'œstradiol et donc la vitellogenèse sont inhibées, et la reproduction est interrompue (Baroiller et Toguyeni, 2004).

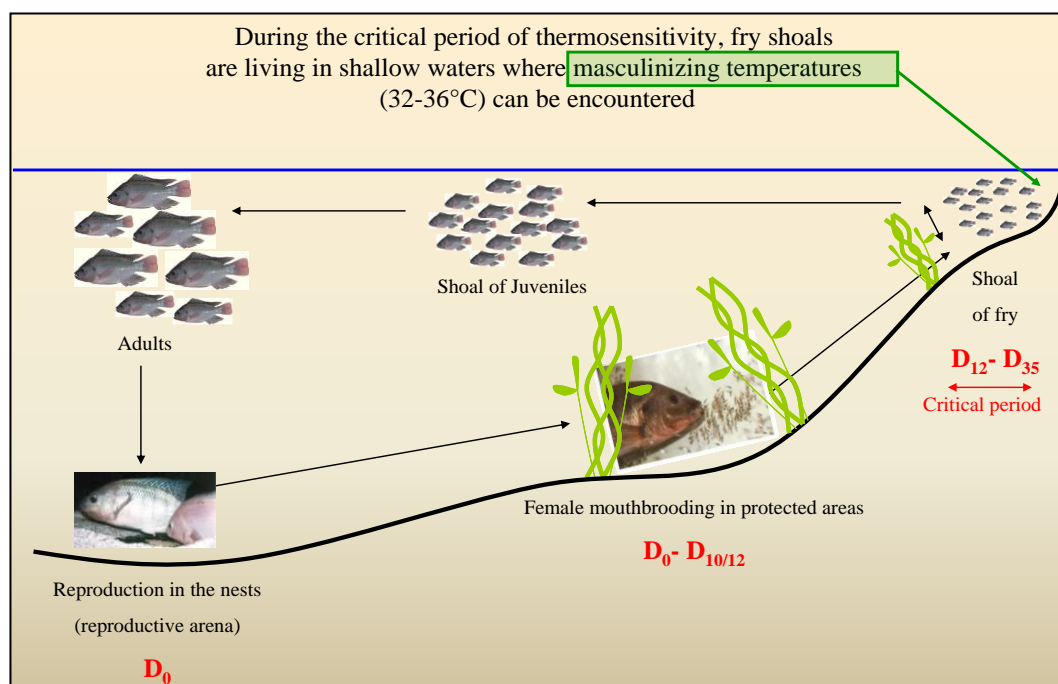


Figure 14. Schéma des migrations du tilapia du Nil, durant son cycle de vie (d'après Bezault *et al.*, 2007).

La thermosensibilité

Des croisements entre plusieurs géniteurs femelles et mâles selon un schéma di-allèle associés à l'étude des sex-ratios de leurs descendances traitées ou non à des températures masculinisantes, ont permis de démontrer une interaction génotype-température chez *le tilapia du Nil* (Baroiller *et al.*, 1995b ; Baroiller et Clota, 1998 ; Baroiller et D'Cotta, 2001 ; Baroiller *et al.*, 2009). En effet, certaines descendances XX ne sont pas sensibles à un traitement aux fortes températures alors que d'autres sont extrêmement sensibles et leurs sex-ratios peuvent même parfois, mais très rarement, atteindre les 100% de mâles (Baroiller *et al.*, 1995a ; Baroiller *et al.*, 2009). Ces croisements ont également démontré l'existence d'effets parentaux sur la thermosensibilité car un même mâle croisé avec plusieurs femelles différentes peut engendrer des descendances sensibles et d'autres non-sensibles à la température. Il en est de même quand la ponte d'une même femelle est fractionnée et fécondée par plusieurs mâles (Baroiller et Clota 1998 ; Baroiller et D'Cotta, 2001 ; Baroiller *et al.*, 2009). La sensibilité à la température est un trait héritable (**Figure 15**) et elle est aussi présente dans les populations sauvages. Des reproducteurs ont été capturés dans le milieu naturel de plusieurs régions d'Afrique présentant différents types de régimes thermiques et des descendances ont été produites à partir de ces reproducteurs (Altena et Hörstgen-Schwark, 2002 ; Tessema *et al.*, 2006 ; Bezault *et al.*, 2007 ; Baroiller *et al.*, 2009).

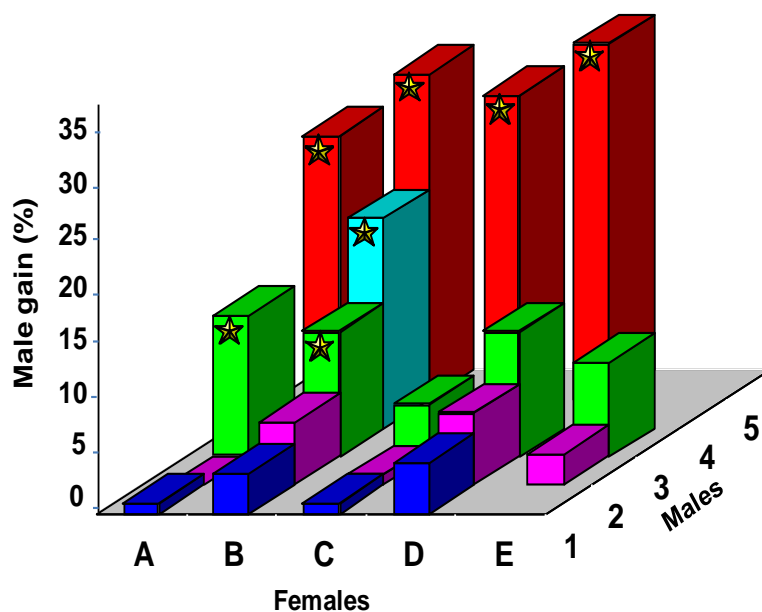


Figure 15. Effets parentaux sur la thermosensibilité d'*O. niloticus*, montrés par un schéma diallèle impliquant le croisement de 5 femelles (A à E) par 5 mâles (1 à 5). Chaque descendance est divisée en deux groupes, respectivement élevés à la température optimale de 27°C (contrôle) et 36°C (température masculinisante). La figure représente l'écart de sexe ratio (% de gain de mâles à 36°C par rapport à la proportion de mâle à 27°C). * différences significatives (d'après Baroiller et D'Cotta, 2001).

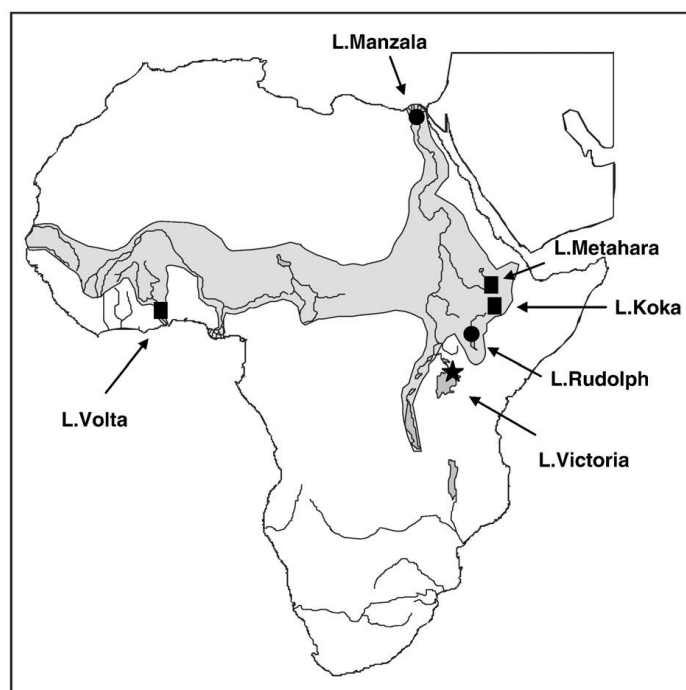


Figure 16. Aire de répartition naturelle du tilapia du Nil, *O. niloticus* (en gris), avec les localisations d'échantillonnage de 6 populations sauvages investiguées pour tester leur détermination sexuelle : les lacs Manzala (Egypte), Rudolph (Kenya), Volta (Ghana), Koka & Metahara (Ethiopie). Les symboles correspondent aux références suivantes : ★ Altena et Hörstgen-Schwark, 2002 ; ● Tessema *et al.*, 2006 ; ■ Bezault *et al.*, 2007.

Les descendances, provenant de 6 populations naturelles (**Figure 16**), ont montré des sex-ratios équilibrés (50:50) aux températures contrôles de 27°C. Par contre, à 35-36°C, des descendances thermosensibles sont mises en évidence dans toutes les populations sauvages, mais avec de grosses différences : ainsi, en moyenne, 61,4% et 80,6 de mâles sont observés après traitement à fortes températures dans les populations respectivement les moins et les plus sensibles. Par ailleurs, dans la population la moins sensible, 27% des descendances sont thermosensibles, contre 94% dans la population la plus sensible. Ceci reflète bien les interactions entre facteurs génétiques et environnementaux dans le déterminisme du sexe chez le tilapia (Baroiller *et al.*, 2009a).

5.2. Intérêt du contrôle du sexe et de la stérilisation en aquaculture

La population mondiale continue de s'accroître rapidement passant de 6,1 milliards d'habitants en 2000 à 7,2 milliards en 2013. Elle pourrait atteindre 8,1 milliards en 2025 et 9,6 milliards d'individus en 2050 (ONU, 13 juin 2013). La demande en apport protéique de haute qualité, plus particulièrement en provenance des ressources aquatiques, augmente considérablement (Diana, 2009). L'aquaculture est actuellement le segment croissant de production d'aliment dans le monde. Parmi toutes les productions animales, elle est celle qui présente le plus fort taux de progression, avec près de 13% de croissance par an, et elle fournit environ 50% de la consommation mondiale en poisson (Chevassus-au-Louis et Lazard, 2009). Cet accroissement de la production d'aquaculture impacte nécessairement les stocks naturels puisque jusqu'ici les aliments des poissons d'élevage reposaient fortement sur l'utilisation de farines et d'huiles de poissons issues des pêches. Or, les captures des pêches ont atteint leur maximum et, dans beaucoup de cas, les stocks sont déjà surexploités (Dunham *et al.*, 2000). Une seconde préoccupation concernant l'aquaculture est liée à ce qu'on appelle couramment les pollutions génétiques, provoquées par les poissons échappés des élevages, qui peuvent soit se reproduire entre eux (et prendre la place d'autres espèces naturelles), soit se reproduire avec des individus sauvages de la même espèce, et progressivement introgresser le génome sauvage par le génome domestique. Mais il faut cependant faire une distinction entre les poissons élevés dans des cages en mer ou en étangs connectés avec des systèmes hydriques naturels, où les risques sont réels, et ceux élevés à terre, en circuits fermés. Il est, par conséquent, essentiel de développer des alternatives responsables et durables, telles que la stérilisation systématique des espèces aquacoles d'intérêt économique, qui permettra d'une part de mieux valoriser les intrants (l'énergie est orientée vers la croissance et non vers la

reproduction), et d'autre part, éliminera le risque de pollutions génétiques. Indépendamment de cette approche de stérilité, il existe, chez beaucoup d'espèces d'élevage, un dimorphisme sexuel de croissance, qui peut être facilement valorisé par la production de populations monosexes mâles ou femelles (selon les espèces, c'est le mâle ou la femelle qui présente les meilleures performances). Ainsi, des truites arc-en-ciel monosexes femelles (sexe le plus intéressant en élevage chez les salmonidés), mais aussi stériles (meilleure utilisation de l'aliment et sans risque génétique pour l'environnement) sont déjà produites à grande échelle en France. Des salmonidés 100% femelles triploïdes sont également produits en Italie, UK, Canada ...

L'amélioration de l'efficacité de la production de poissons peut aussi être obtenue en optimisant les performances des systèmes d'élevages sur la base des espèces utilisées. Ainsi, il est important de choisir des espèces qui permettront une meilleure préservation des stocks naturels de poissons par leur régime omnivore ou herbivore. Ces choix limiteront ainsi les rejets de types azotés et phosphorés. De même, il serait logique de favoriser des espèces et des systèmes d'élevage pour lesquels des traitements (antibiotiques, désinfectants, hormones, éléments métalliques) qui peuvent avoir une incidence sur la qualité d'eau du milieu ne soient pas indispensables. Enfin, la possibilité de limiter l'impact de l'aquaculture sur la biodiversité en stérilisant les animaux par des approches simples et respectueuses de l'environnement et du consommateur reste un challenge pour beaucoup d'espèces d'aquaculture. Face à ces enjeux, tant pour l'alimentation des populations que pour la préservation de l'environnement et de sa biodiversité, les tilapias présentent un intérêt évident.

5.3. Intérêt économique et importance du contrôle du sexe, chez le tilapia du Nil.

Les tilapias représentent une ressource considérable pour l'alimentation humaine, en particulier dans les pays du Sud et, avec une production mondiale de plus de 4,3 millions de tonnes par an, ils constituent, après les carpes, le second groupe majeur de l'aquaculture mondiale (FAO 2013). Les tilapias sont produits dans plus de 100 pays, mais alors qu'il est originaire du continent africain, l'essentiel de sa production est réalisée en Asie, qui représente plus de 80% de la production mondiale de tilapia. Parmi ce groupe d'espèces, le tilapia du Nil est celle qui est la plus produite (**Figure 17**). En effet, il possède de nombreuses

caractéristiques recherchées en aquaculture. Il s'adapte facilement à la plupart des conditions d'élevage, est extrêmement résistant aux maladies et croît rapidement. De par son régime alimentaire microphytophage (plancton végétal et cyanobactéries) et son grand opportunisme (omnivore), il nécessite moins d'apports en protéines animales que les autres espèces et accepte facilement l'aliment artificiel dès la première alimentation. Enfin, en conditions photopériodiques et thermiques favorables, il se reproduit de façon continue tout au long de l'année. Certaines prospectives (Fitzsimmons, 2000) positionnent le tilapia comme l'espèce susceptible d'être la plus produite au 21^e siècle et de remplacer certaines espèces marines en situation de surexploitation. On peut estimer, très globalement, que la production de tilapia répond aujourd'hui aux exigences du développement durable.

Le mode de reproduction des tilapias, qui constitue évidemment un avantage pour la production d'alevins, est aussi un handicap. En effet, leur maturation sexuelle précoce et leur reproduction continue provoquent une rapide surpopulation en milieu fermé (étang, bacs...), se traduisant par un nanisme des individus (baisse de la croissance) et impactant donc négativement le rendement de production dans les fermes (Baroiller et Jalabert, 1989 ; Mair *et al.*, 1995). Chez les femelles, l'énergie, apportée par l'alimentation, est fortement mobilisée par la production hépatique de vitellogénine pendant la vitellogenèse au lieu d'être utilisée pour leur croissance. Par ailleurs, le comportement d'incubation buccale les conduit à jeûner pendant une dizaine de jours pour chaque cycle sexuel (27 jours en moyenne).

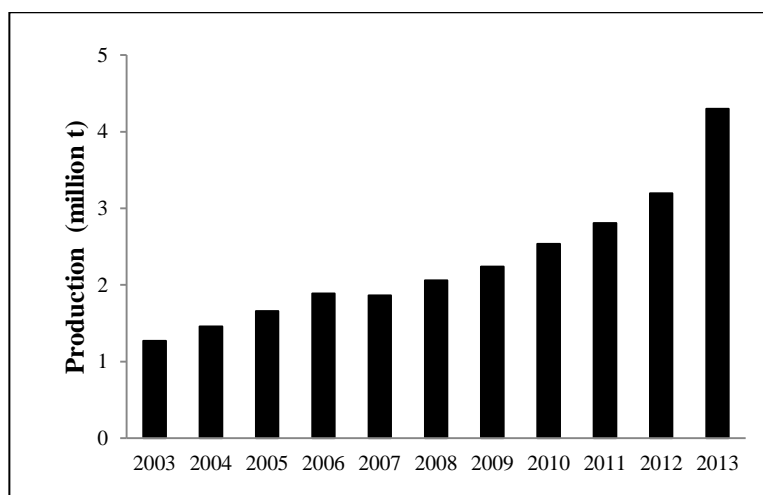


Figure 17. Production du tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus*, en million de tonnes, de 2003 à 2013 (source : FAO, 2013).

Pour éviter ces problèmes et améliorer le rendement en produisant des individus à forte croissance (**Figure 18**), le contrôle du sexe est généralement utilisé pour produire des populations 100% mâles, appelées aussi populations monosexes mâles chez le tilapia du Nil (Baroiller et Jalabert, 1989). Différentes pratiques existent pour produire des populations monosexes mâles chez le tilapia. Le sexage manuel, l'inversion hormonale par administration d'androgènes *via* l'alimentation, l'hybridation, les approches génétiques de production et utilisation de mâles YY peuvent conduire au développement de populations à prédominance ou complètement mâles (Hickling, 1960; Baroiller et Jalabert, 1988 ; Baroiller et D'Cotta, 2001). Les deux méthodes les plus utilisées actuellement dans les fermes aquacoles sont l'inversion hormonale (qui est de très loin l'approche privilégiée par la profession) et l'utilisation des mâles YY (Scott *et al.*, 1989), mais toutes les deux ont leurs limites. En effet, les traitements hormonaux soulèvent des questions dans le domaine de la sécurité sanitaire des aliments et de l'impact des résidus des traitements sur la santé des travailleurs aquacoles, l'environnement et la biodiversité (Baroiller et Jalabert, 1989 ; Baroiller et D'Cotta, 2001). Pour ce qui est de l'utilisation des « super-mâles » YY, elle repose sur un contrôle génétique du sexe.



Figure 18. Différences de croissance entre les mâles (à gauche) et les femelles (à droite) d'une même descendance de tilapia du Nil, *O. niloticus*.

Chez le tilapia du Nil, le sexe est gouverné par 3 facteurs (Baroiller *et al.*, 2009a) (**Figure 19**):

- un système de déterminisme sexuel génétique (GSD), avec une hétérogamétie mâle XX/XY
- des facteurs génétiques mineurs (effet parental)
- la température (facteur de l'environnement)

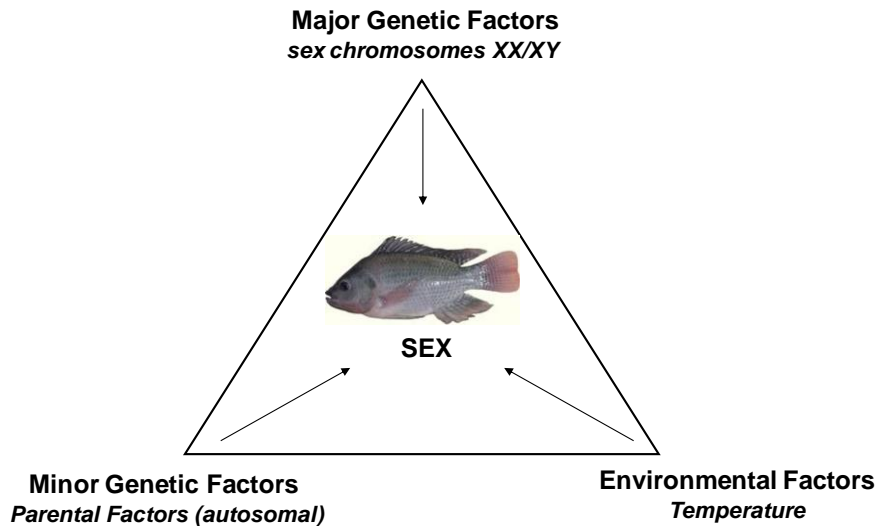


Figure 19. Schéma représentant la complexité du déterminisme du sexe chez le tilapia, et montrant les 3 facteurs influençant le sexe : le(s) déterminant(s) majeur(s) porté(s) par les chromosomes sexuels XX/XY, les facteurs génétiques mineurs apportés par les 2 parents, et la température (d'après Baroiller *et al.*, 2009a,b).

La production de mâles YY repose sur la possibilité d'inversion fonctionnelle du sexe chez le tilapia (comme chez les autres espèces de poisson) à des stades précoces (première alimentation). En l'absence de marqueurs moléculaires des chromosomes X et Y, l'obtention de mâles et de femelles YY nécessite près de 3 années :

- production de femelles XY puis identification par testage en descendance (année 1),
- production de mâles YY par croisement de femelles XY avec des mâles XY, puis identification par testage en descendance (année 2),
- production de femelles YY par croisement de femelles XY avec des mâles YY et féminisation de la descendance, puis identification par testage en descendance (année 3). Ces femelles YY permettront de produire un grand nombre de mâles YY (croisement YY femelle avec YY mâle) qui seront vendus aux aquaculteurs.

Cependant, compte tenu de la complexité du déterminisme du sexe chez le tilapia, les mâles YY donnent rarement 100% de mâles dans leurs descendance (présence de facteurs génétiques mineurs). Il faut donc ensuite sélectionner des mâles YY et des femelles XX qui ne sont pas ou peu porteurs des facteurs génétiques mineurs, et qui donneront entre 95 et 100% de mâles. Cela nécessite plusieurs générations de sélection (une année par génération).

5.4. Effet de la température sur la différenciation sexuelle du tilapia

La tendance actuelle est de rechercher des approches plus écologiques pour la production de populations monosexes mâles dans les fermes aquacoles. Le traitement par les fortes températures, qui masculinisent les individus génétiquement XX en mâles phénotypiques, constitue l'une de ces approches possibles.

Chez les amphibiens, poissons et reptiles, les œstrogènes présents dans la gonade induisent le développement ovarien (Yamamoto 1969 ; Nakamura *et al.*, 1998). L'enzyme aromatase catalyse la conversion des androgènes aromatisables en œstrogènes (en particulier l'œstradiol-17 β ou E2) et, si la synthèse ou l'activité de cette enzyme est inhibée, la production d'œstrogènes est bloquée, ce qui engendre une inversion sexuelle des femelles en mâles (Baroiller *et al.*, 1999 ; Guiguen *et al.*, 1999, 2009 ; Kwon *et al.*, 2000 ; Baroiller *et al.*, 2014).

Chez les tilapias, Baroiller *et al.* (1995) ont démontré que des traitements à fortes températures (>32°C) peuvent induire une différenciation testiculaire chez certaines descendance génétiquement femelles (XX). En effet, la présence de mâles XX a été démontrée chez les individus traités. Lors du développement gonadique ovarien des poissons XX, le gène *cyp19a* gonadique (ou *cyp19a1a*) est surexprimé (D'Cotta *et al.*, 2001a ; Kwon *et al.*, 2001 ; Ijiri *et al.*, 2008). Effectivement, des niveaux élevés d'expression de *cyp19a1a* sont retrouvés dans les futurs ovaires, très précocement, dès l'âge de 9 dpf, et ils vont augmenter très rapidement jusqu'à 19 dpf. Les individus XY, quant à eux, ont un niveau d'expression de *cyp19a1a* très faible dans leurs gonades. Par ailleurs, les mécanismes moléculaires de la masculinisation induite par un traitement à de fortes températures, appliqué avant et pendant la différenciation sexuelle, sur une population monosex femelle (XX), passent par une forte inhibition de l'expression du gène de l'aromatase ovarienne qui est visible par PCR en temps réel dès 17 dpf (D'Cotta *et al.*, 2001). Ils provoquent également une baisse d'expression de *foxl2* (Poonlaphdecha *et al.*, 2013), un facteur de transcription impliqué dans l'activation de la transcription de *cyp19a1a* (Wang *et al.*, 2007) (**Figure 20**). De plus, le niveau d'inhibition des taux d'expression de *cyp19a1*, induit par le traitement, est corrélé avec la proportion d'individus XX masculinisés par les fortes températures (XX TM) (D'Cotta *et al.*, 2008). De façon intéressante, si l'expression du gène de l'aromatase gonadique est sexuellement dimorphique pendant la différenciation sexuelle (D'Cotta *et al.*, 2001), en revanche le gène de l'aromatase cérébrale (*cyp19a1b*) ne l'est pas

(Kwon *et al.*, 2001 ; Chang *et al.*, 2005). Par contre, non seulement l'activité enzymatique de l'aromatase est bien dimorphique dans le cerveau pendant cette période, elle est très élevée dans le cerveau femelle comparé au cerveau mâle, mais de plus, les fortes températures inhibent cette activité dans le cerveau des femelles comme des mâles traités à 36°C. (D'Cotta *et al.*, 2001).

Un des principaux acteurs de la voie de différenciation testiculaire est le gène de l'hormone antimüllérienne, l'*amh*. Ce gène est responsable de la régression des canaux de Müller chez les mammifères, mais les poissons n'ayant pas de canaux de Müller, il inhibe la sécrétion des androgènes et la prolifération et différenciation des spermatogonies chez les adultes poisson-zèbre (Male *et al.*, 2014). Une augmentation de l'*amh* est d'abord observée dans les cerveaux mâles XY de 10 à 15 dpf (Poonlaphdecha *et al.*, 2011), puis dans un deuxième temps dans les gonades mâles après 19 dpf (Ijiri *et al.*, 2008 ; Poonlaphdecha *et al.*, 2011) comparativement aux femelles XX. Dans les gonades XX TM, l'*amh* et *sox9s* augmentent beaucoup plus rapidement que chez les mâles XY, dès 3 jours après le début du traitement (Poonlaphdecha *et al.*, 2013). Une augmentation de *dmrt1* a également lieu. Chez les XX-TM, cette élévation d'expression d'*amh*, *sox9s* et *dmrt1* a lieu avant la suppression de l'expression de *cyp19a1a* (Poonlaphdecha *et al.*, 2013) et *dmrt1* pourrait donc réprimer l'expression de celle-ci (Wang *et al.*, 2010) (**Figure 20**).

Les hautes températures engendrent une inversion sexuelle des femelles génétiques de tilapias du Nil en inhibant l'expression des gènes impliqués dans la différenciation ovarienne et en stimulant ceux de la voie mâle.

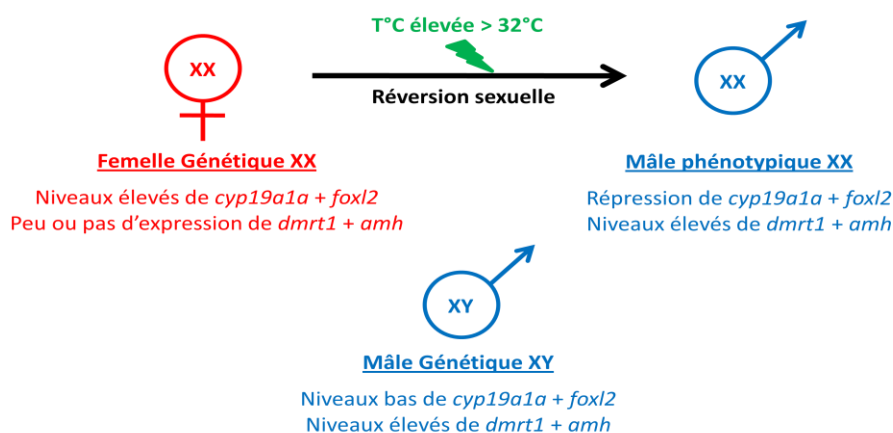


Figure 20. Les fortes températures régulent également l'expression de nombreux gènes, avec notamment, une stimulation des gènes connus pour être impliqués dans la différenciation testiculaire (*Dmrt1*, *Amh*), et une inhibition des gènes de la voie de différenciation ovarienne (*Foxl2*, *cyp19a1*) (modifié d'après D'Cotta *et al.*, 2001; Baroiller *et al.*, 2009 ; Poonlaphdecha *et al.*, 2012).

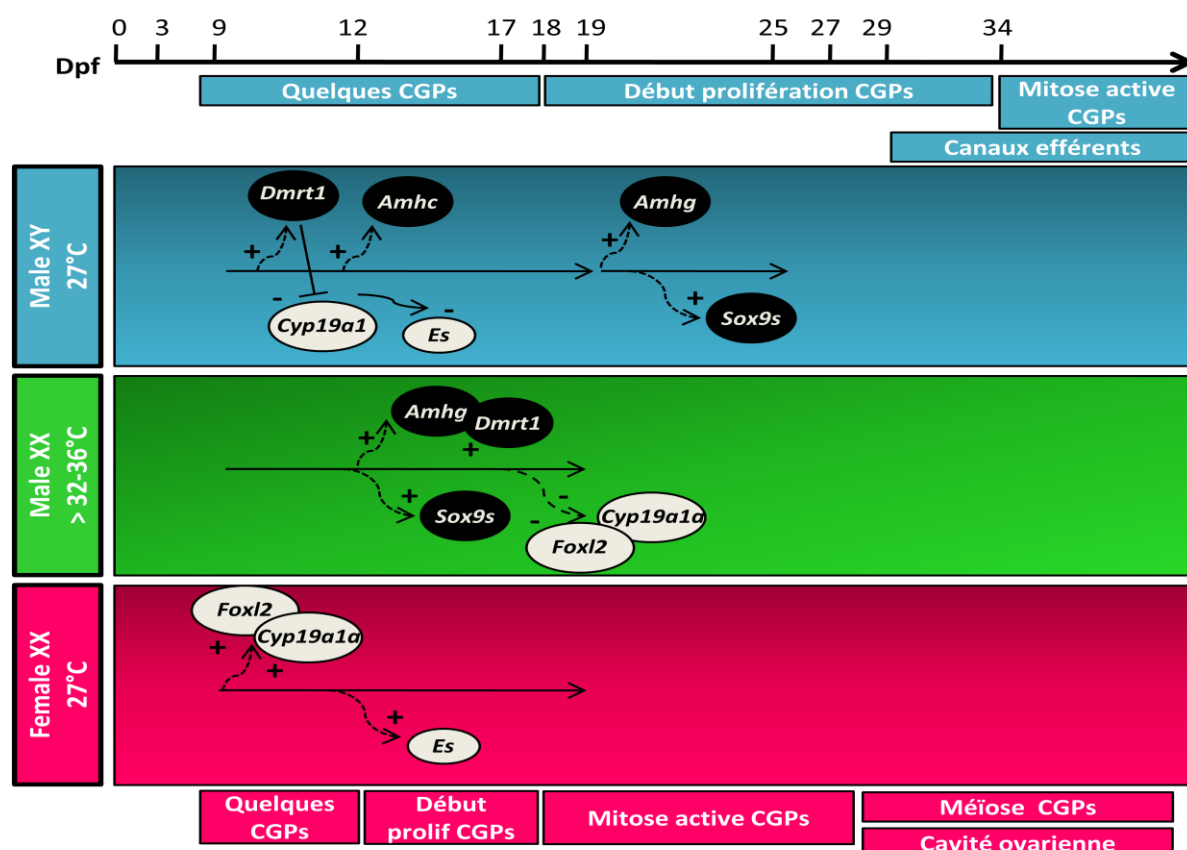


Figure 21. Représentation schématique du patron d'expression des gènes impliqués dans la voie de différenciation sexuelle, présents dans les gonades de tilapias mâles XY (rectangle bleu), femelles masculinisées par la température (XX-TM - rectangle vert) et femelles XX (rectangle rose). L'échelle est représentée en "days post-fertilization" (dpf). Les cercles blancs représentent les gènes du développement ovarien (*cyp19a1a*, *foxl2*) tandis que les cercles noirs représentent les gènes du développement testiculaire (*amhc*, *amhg*, *dmrt1*, *sox9s*) (d'après D'Cotta *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2007, 2010 ; Baroiller *et al.*, 2009a ; Poonlaphdecha *et al.*, 2011, 2013).

5.5. Stérilité et tilapia

Utilisation des manipulations génétiques : la triploïdisation

Chez le tilapia du Nil, Hussain *et al.* (1991) ont identifié le traitement optimal d'induction de la triploïdie en utilisant les chocs chauds, froids et de pression, sur des œufs de tilapias qui viennent d'être fécondés. Cependant, pour établir à quel moment il est pertinent d'appliquer ce traitement, une bonne connaissance de la période où survient la seconde division méiotique chez le tilapia est nécessaire. L'étude a été réalisée sur des œufs provenant de femelles tilapias de la souche Manzala. Les résultats obtenus suggèrent que le processus de méiose peut être perturbé durant une fenêtre très étroite d'environ 2 min, qui se situe entre 8 – 10 min (9 min) après la fécondation à 28°C. Des traitements tardifs augmentent la survie de l'espèce, mais

sont inefficaces pour induire la triploïdie car la seconde division de méiose a déjà eu lieu. Par ailleurs, l'augmentation de la température ayant pour effet d'avancer tous les processus biologiques, le temps d'administration du choc chaud doit se faire plus précocement que le choc pression, dès 5 min après la fécondation, pendant 3 à 5 min à une température de 41°C. Ces résultats s'avèrent similaires à ceux de Chourrout et Itskovitch (1983) et Penman *et al.* (1987). En ce qui concerne l'expérimentation de l'induction de la triploïdie par un choc froid, le meilleur pourcentage d'individus triploïdes est obtenu après une exposition de 30 min à un choc de 9°C, 7 min après la fécondation. Le rendement du traitement par choc pression est beaucoup plus élevé (77.2 %) que par choc chaud (42.2 à 60.2%) et choc froid (19.4 à 35.7%).

Les travaux plus récents de Pradeep *et al.* (2010 et 2011) sur le tilapia rouge, ont permis d'améliorer et homogénéiser l'efficacité des traitements par choc chaud et froid, respectivement 94.4% et 98.8% d'individus triploïdes, en avançant l'induction de la triploïdie à 4 min après la fécondation. Par contre, le pourcentage de survie est toujours inférieur chez les triploïdes par choc chaud et froid (respectivement 75% et 66%) par rapport au groupe témoin diploïde (82%). Ils ont également permis d'améliorer le rendement de 42.2 - 60.2% (Hussain *et al.*, 1991) à 70.8% pour le choc chaud et de 19.4 - 35.7% (Hussain *et al.*, 1991) à 65.1% pour le choc froid. Par ailleurs, l'induction de la triploïdie par choc chaud orienterait le sex-ratio vers les mâles, avec 84.1% d'individus mâles contre 54.7% de mâles chez le groupe traité par choc froid et 50.9% de mâles chez le groupe contrôle diploïde (Pradeep *et al.*, 2012) (**Tableau 1**).

Auteurs	Traitement				% efficacité	% survie	% Rendement	Espèce
	Choc	Intensité optimale	Durée	Temps après fécondation				
Hussain <i>et al.</i> , 1991	pression	8.000 psi	2 min	9 min	84.8	91,8	77,8	<i>O. niloticus</i> , Tilapia du Nil - souche Manzala
	chaud	41°C	3-5 min	5 min	70.3	60 à 85.7	42.2 à 60.2	
	froid	9°C	30 min	7 min	37.2	52.1 à 96	19.4 à 35.7	
Pradeep <i>et al.</i> , 2010 - 2011	chaud	41°C	5 min	4 min	94.4	75	70.8	<i>O. Hybride</i> , Florida Red Tilapia ou Tilapia rouge
	froid	9°C	30 min	4 min	98.8	66	65.1	

Tableau 1. Tableau synthétique des différents traitements d'induction de la triploïdie chez le tilapia du Nil et le tilapia rouge (Modifié de Hussain *et al.*, 1991 ; Pradeep *et al.*, 2010, 2011).

Utilisation d'une plante médicinale, la graine de papaye *Carica papaya*

La graine de papaye *Carica papaya* pourrait être utilisée comme agent de contrôle de la fertilité du tilapia du Nil. En 2003, Ekanemm et Okoronkwo ont testé ce traitement oral chez le tilapia du Nil afin de déterminer 1) si des extraits de graine de papaye incorporés dans l'alimentation, peuvent induire une stérilité chez le mâle tilapia, *Oreochromis niloticus* ; 2) son mode d'action sur les testicules ; 3) la pérennité de cet effet. Des juvéniles mâles et femelles de tilapias du Nil (environ 40g) sont traités à deux doses : une dose faible de 4.9g/kg/j d'extrait de graines de papaye et une dose élevée de 9.8g/kg/j. L'analyse des coupes histologiques des testicules a révélé une distribution normale des cellules spermatiques chez l'animal témoin tandis que des cellules spermatiques avec des noyaux gonflés sont observées chez les poissons traités à faible dose et une désintégration des cellules spermatiques chez les poissons traités à la forte dose. La reproduction des poissons, quelques semaines après l'arrêt du traitement à faible dose, démontre que la graine de papaye peut être utilisée de façon réversible pour contrôler la reproduction d'*O.niloticus*.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Udoh et Kehinde (1999) qui avaient étudié l'effet de l'administration de la graine de papaye à une dose faible de 50 mg/kg/j et à une forte dose de 100 mg/kg/j sur des rats mâles. Seule la forte dose provoque la désintégration d'un grand nombre de cellules rendant le testicule pratiquement dépourvu en cellules spermatiques et a donc un effet pérenne de stérilisation sur la gonade. L'effet réversible de l'action de la graine de papaye lors d'un traitement à une faible dose est due au fait que les dommages sur les testicules sont minimes et qu'ils peuvent être réparés après quelques semaines. Cependant, le faible nombre d'alevins produits chez les animaux traités à la faible dose par rapport aux animaux contrôles, montre que même cette faible dose a des effets délétères sur les testicules, mais aussi sur les ovaires du tilapia. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Gary et Garg (1971) et ceux de Udoh et Kehinde (1991) sur des rats. Des études futures doivent être menées pour confirmer que le glycoside oléanique est la molécule responsable de la stérilité d'*O.niloticus* comme déjà démontré chez les rats (Das, 1980). Abbas et Abbas (2011) ont confirmé les résultats obtenus chez le tilapia du Nil par Ekanemm et Okoronkwo (2003). Ils ont étudié l'impact d'un traitement de 30 jours par des extraits de graine de papaye incorporés dans l'aliment, à une faible dose de 3g/kg/j et à une forte dose de 6g/kg/j, sur des mâles matures de tilapias. Comme dans l'étude d'Ekanemm et Okoronkwo (2003), ils ont montré que les graines de papaye induisaient une stérilité permanente chez les poissons traités à une forte dose tandis que les effets sont

réversibles chez les animaux traités à une faible dose. En effet, les coupes histologiques des testicules ont montré une désintégration des cellules spermatiques et une nécrose centrale des tubes séminifères des animaux traités à la forte dose.

Les avantages de l'utilisation de la graine de papaye sont multiples : c'est une technique qui semble pouvoir contrôler la reproduction du tilapia du Nil, elle est peu onéreuse, les graines sont faciles à obtenir par rapport aux hormones et elles peuvent être introduites dans l'alimentation. Cependant des inconvénients doivent être pris en compte : un traitement à une forte dose induit une stérilisation pérenne mais il a de lourds effets physiologiques et biologiques, notamment une baisse de la qualité de la chair, une chute progressive des érythrocytes, de la teneur en hémoglobine et une hausse des niveaux d'urée, de créatinine, d'aminotransférase alanine (ALT) et aspartate (AST), de glucose, de protéines totales et de leucocytes (Abbas et Abbas, 2011).

Technique de stérilisation	Avantages	Inconvénients
Manipulations génétiques Triploïdisation par chocs thermiques	Technique considérée comme la plus pratique, la plus économique et la plus efficace pour une production de poissons stériles à grande échelle (Maxime, 2008). Très utilisée chez les salmonidés.	La stérilité fonctionnelle de 100% des individus, surtout des mâles, n'est pas assurée donc pas de garantie totale d'absence de risques des échappés triploïdes (n) dans le milieu naturel. Les consommateurs restent inquiets sur les approches de manipulations chromosomiques, les assimilant faussement aux OGMs. Mortalité plus élevée chez beaucoup d'espèces avec les chocs thermiques comparés aux chocs pression
Manipulations génétiques Triploïdisation par chocs pression	Technique considérée comme la plus pratique, la plus économique et la plus efficace pour une production de poissons stériles à grande échelle (Maxime, 2008). Très utilisée chez les salmonidés.	La stérilité fonctionnelle de 100% des individus, surtout des mâles, n'est pas assurée donc pas de garantie totale d'absence de risques des échappés triploïdes (n) dans le milieu naturel. Les consommateurs restent inquiets sur les approches de manipulations chromosomiques, les assimilant faussement aux OGMs. Coûts de production très élevés pour des pisciculteurs des pays du sud
Manipulations chimiques Graine de papaye	Technique peu couteuse : les extraits de graines de papaye sont faciles à obtenir par rapport aux hormones, elles peuvent être introduites dans l'aliment et semblent contrôler la reproduction chez le tilapia	Les fortes doses induisent une stérilité pérenne, mais ont de lourds effets biologiques et physiologiques sur l'organisme comme la baisse de la qualité de la chair

Tableau 2. Résumé des approches de stérilisation utilisées ou pouvant être utilisées en pisciculture (d'après Pandian et Koteeswaran 1998 ; Devlin et Nagahama 2002 ; Linhart et al., 2006 ; Maxime 2008 ; Piferrer et al., 2009 ; Ekanemm et Okoronkwo, 2003 ; Abbas et Abbas, 2011).

Objectifs du travail

Ma thèse a été financée sur une période de 3 ans par le CIRAD, centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.

Comme exposé dans l'introduction, une stérilisation systématique des populations d'aquaculture permettrait de s'affranchir des possibles pollutions génétiques engendrées par cette production, tout en bénéficiant d'une meilleure croissance moyenne des poissons. La triploïdisation est aujourd'hui la technique la plus utilisée en aquaculture, mais les avis des consommateurs et associations écologistes vis-à-vis de ces manipulations chromosomiques restent contrastés. Un traitement alternatif, non chromosomique, écologique constitue donc un enjeu majeur pour l'aquaculture.

L'objectif principal de ce travail est d'étudier les effets d'une stérilisation induite par les très hautes températures sur le développement gonadique d'une espèce de poisson tropical d'intérêt majeur pour l'aquaculture, le tilapia du Nil *Oreochromis niloticus*.

- Au début de mes travaux de recherches doctorales, des études sur la thermosensibilité et la différenciation du sexe démontraient l'effet masculinisateur des hautes températures (>32°C) sur la gonade d'individus génétiques femelles (XX) de tilapias du Nil et la probable existence de mâles XX dans des populations sauvages (Bezault *et al.*, 2007 ; Baroiller *et al.*, 2009). Il avait aussi été constaté que des expositions à des températures élevées au stade alevin avant la différenciation sexuelle, induisant des phénotypes mâles, régulaient l'expression de nombreux gènes, avec une forte inhibition de l'expression de l'aromatase ovarienne *cyp19a1a* ainsi que de *foxl2* et une sur-expression de *dmrt1*, chez le tilapia du Nil (D'Cotta *et al.*, 2001a ; Baroiller *et al.*, 2009). Associés à ces travaux, quelques papiers faisaient état d'un impact faible ou très fort, selon les auteurs, des très fortes températures sur la fertilité de la gonade, avec en particulier la présence de gonades partiellement ou totalement stériles, suggérant qu'un même traitement peut aussi bien masculiniser des gonades femelles chez certains individus/certaines souches, ou induire une stérilité chez d'autres (Nakamura et Nagahama, 1995 ; Baroiller et Clota, 1998). Au sein de notre laboratoire, des traitements à la température de 36°C pendant 30 jours sont utilisés

pour masculiniser les gonades des femelles génétiques (XX) (Poonlaphdecha *et al.*, 2011 et 2013).

Nous nous sommes donc posé les questions suivantes :

➤ **(1) Une forte température de 37°C peut-elle stériliser des alevins femelles et mâles tilapias du Nil ? Et quelle est la durée optimale : 30 ou 60 jours ?**

En se basant sur les données précédentes, il apparaît possible qu'un traitement température 37°C soit adéquate pour stériliser les individus ; il était donc important de valider ces résultats. Aussi, nous avons entrepris, dans un premier temps, des traitements températures de 37°C sur des alevins âgés de 10 dpf, sur une période de 30 jours (1 mois), de 2011 au premier trimestre 2013, puis sur une période de 60 jours (2 mois) de mi-2013 à 2014.

Des descendances monosexes femelles, avec 100% d'individus génétiquement femelles (XX) et monosexes mâles, avec 100% d'individus génétiquement mâles (XY) ont été utilisées. L'obtention de ces descendances monosexes, indispensables pour pouvoir répondre à la deuxième question posée, sera détaillée dans le matériel et méthodes de ma thèse (partie 2).

- Nous nous sommes ensuite posés la question de savoir si cette fragilité des cellules germinales n'a lieu qu'à des stades précoces ou si elle se produit également plus tardivement chez notre souche Manzala d'*O. niloticus* :

➤ **(2) A quels stades les gonades présentent-elles la plus forte sensibilité aux traitements températures stérilisantes de 37°C ?**

- A 10 dpf ? Avant la différenciation sexuelle, quand elles ne contiennent qu'une 40aine de cellules germinales primordiales (CGP) ?

- A 110 dpf, pendant la maturation sexuelle, en première spermatogenèse/ovogenèse ?

Pour répondre à cette seconde question, nous avons lancé en 2012/2013 des traitements 37°C sur des descendances monosexes mâles et femelles, et mixtes,

sur des tilapias du Nil juvéniles, âgés de 110 dpf, de souche Manzala, en parallèle des traitements 37°C chez les alevins.

Ensuite nous avons comparé les résultats obtenus chez les alevins avec ceux obtenus chez les juvéniles à trois niveaux : macroscopique, cellulaire et moléculaire.

- **(3) Est-ce que les cellules germinales sont plus sensibles au traitement à la haute température de 37°C chez les mâles ou les femelles ? Ou cette sensibilité à la température des CGs est-elle équivalente chez les 2 sexes ?**

Pour répondre à cette question, l'utilisation de descendance monosexes femelles (XX) et mâles (XY) est indispensable. C'est pourquoi nous avons mené la majorité de nos expérimentations alevins et juvéniles sur des descendance 100% femelles (XX) ou 100% mâles (XY).

Nous avons comparé deux à deux les résultats des expérimentations alevins femelles versus mâles, et des expérimentations juvéniles femelles versus mâles.

- Puis, j'ai réalisé une présentation orale au 17th ICCE à Barcelone en juillet 2013 sur l'impact des températures de 37°C sur les gonades d'individus exposés au stade juvénile de 110 dpf pendant 60 jours, chez des descendance monosexes mâles et mixtes *O.niloticus* de souche Manzala. Au cours de ce même congrès, Nakamura *et al.* ont montré dans un poster (Sterilization of male tilapia by high temperature. Nakamura M., Nozu R., Sato K. et Kobayashi T. ICCE 2013) que les effets stérilisants des fortes températures étaient pérennes chez les tilapias *O. mossambicus*. Et très récemment, en mars 2015, une publication précisant les résultats des effets températures sur la gonade de tilapias femelles est parue dans GCE (General and Comparative Endocrinology). Dans ce papier, Pandit *et al.* ont rapporté que la stérilisation induite par la température chez les individus femelles de tilapias du Nil, de souche Chitralada, ne passerait pas par une étape préalable de masculinisation. Cette hypothèse est controversée car il a déjà été démontré des effets masculinisant puis stérilisant des hautes températures chez 2 autres espèces de poissons, médaka et poisson-zèbre.

Nous nous sommes alors posés deux nouvelles questions :

➤ **4) Le traitement 37°C a-t-il induit une stérilisation partielle et transitoire ou complète et pérenne chez *O. niloticus*, de souche Manzala ?**

Pour démontrer la pérennité du traitement 37°C, les coupes de gonades ont été analysées 2 à 6 mois après la fin du traitement.

Nous avons ici démontré par immunohistochimie de la protéine Vasa que le traitement 37°C induisait une perte partielle des cellules germinales aboutissant à une stérilisation partielle chez certains individus ou une perte totale des cellules germinales aboutissant à la stérilisation complète d'autres individus.

➤ **5) Le traitement 37°C passe-t-il quand même par une étape de masculinisation avant l'étape de stérilisation chez notre souche Manzala de tilapias du Nil ?**

Les sex-ratios obtenus dans les groupes traités à 37°C et l'histologie gonadique au moment du sexage, 2 à 6 mois après la fin du traitement, nous permettront d'y répondre.

- L'apoptose des cellules germinales, en réponse à un stress de chaleur, a été considérablement explorée chez les rongeurs (Yin *et al.*, 1997). Il semblerait que ce processus soit également impliqué dans une stérilisation induite chimiquement par le busulfan dans les testicules des souris adultes (Choi *et al.*, 2004). Il a aussi déjà été démontré que des expositions à de fortes températures pouvaient induire une dégénérescence gonadique, via le phénomène d'apoptose des cellules germinales (CGs) chez trois espèces de poissons tels que les pejerreys (Strüssmann *et al.*, 1998 ; Ito *et al.*, 2008a et b ; Majhi *et al.*, 2008), les poissons zèbres (Uchida *et al.*, 2004) et les fugus (Lee *et al.*, 2009). Par contre, il existe très peu de données dans la littérature relatant les mécanismes moléculaires conduisant à la perte des cellules germinales dans les gonades des individus traités et aboutissant à leur stérilité chez le tilapia du Nil. Pour nous, il était donc important d'identifier ces mécanismes moléculaires, ce qui nous a amené à nous poser une dernière question :

- **6) Est-ce que ce mécanisme d'apoptose est également retrouvé chez le tilapia, lors d'une induction de la stérilisation de la gonade par les hautes températures ?**

Est-ce qu'une inhibition de la prolifération des cellules germinales ne serait pas aussi à l'origine de cette diminution du nombre de CG ?

Nous avons procédé à l'analyse des coupes de gonades des individus traités par l'essai TUNEL pour visualiser l'apoptose et à l'immunohistochimie de la protéine PCNA pour visualiser la prolifération cellulaire. Les résultats obtenus chez les traités ont été comparés à ceux des individus contrôles à 27°C.

- Au début de ma thèse, les travaux sur les hautes températures n'en étaient qu'à leur commencement chez le tilapia. Il était donc intéressant de travailler, en parallèle, au moins sur une autre technique de stérilisation.

L'objectif 2 était de s'intéresser aux effets d'une induction de la stérilité par le busulfan, une drogue chimio-thérapeutique déjà connue pour avoir un impact transitoire sur la déplétion des gonades en cellules germinales.

- **L'impact des 2 traitements (température et chimique) sur le développement gonadique sera comparé par l'observation du nombre de cellules germinales, ainsi que par l'analyse des processus d'apoptose des cellules germinales des gonades des individus traités.**

Partie 2 : Matériels et Méthodes

1. Animaux et expérimentations

Des descendances monosexes femelles (XX), monosexes mâles (XY) et mixtes (XX/XY) provenant de géniteurs tilapias du Nil de souche Manzala et Bouaké (produits comme décrit par D'Cotta *et al.*, 2001), ont été utilisées pour mes travaux de recherche doctorale :

- Les descendances 100% femelles sont produites en croisant des femelles normales XX avec des mâles XX (obtenus par traitement à la 17 méthyltestostérone - **Figure 22**).
- Les descendances 100% mâles sont obtenues par croisement de femelles normales XX avec des super-mâles YY (produits en troisième génération à partir de mâles féminisés par les œstrogènes croisés avec des mâles normaux XY - **Figure 23**).
- Les descendances mixtes sont produites en croisant des femelles normales XX avec des mâles normaux XY. Après la fécondation naturelle, les œufs ont été collectés de la bouche des femelles à 8 jours post-fécondation (dpf) et ont été incubés à 27°C dans des bouteilles mcdonals.

Puis les poissons ont été élevés dans les infrastructures expérimentales du CIRAD en circuit fermé à une photopériode constante (12:12) et nourris *ad libitum* après leur naissance.

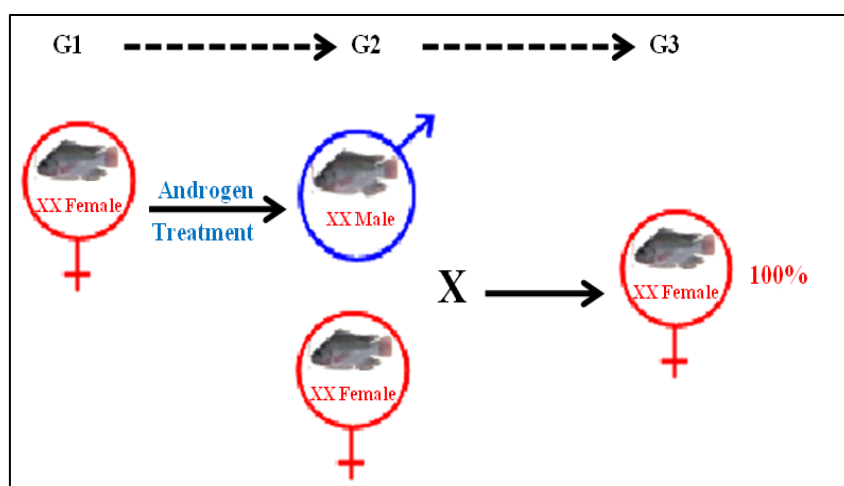


Figure 22. Production des monosexes femelles (XX) utilisées pour l'article 1 et le chapitre 3 des résultats.

G : génération.

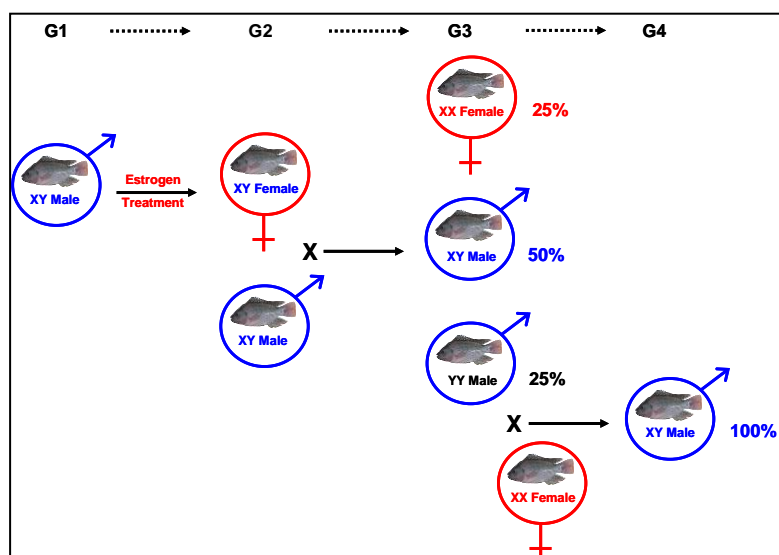


Figure 23. Production des descendance monosexes mâles (XY) utilisées pour l'article 2 et chapitre 3 des résultats. G : génération.

1.1. Traitements températures des alevins

Des descendance monosexes femelles (XX) et mâles (XY) ont été traitées à la température de 37°C sur une durée de 30 ou 60 jours. Les alevins de chacune des descendance ont été divisés en deux groupes à l'âge de 10 jours post fécondation (dpf) : le groupe témoin élevé à la température contrôle de 27°C (Fry-27°C) et le groupe traité à la haute température de 37°C (Fry-37°C). A la fin du traitement (30 ou 60 jours), les groupes Fry-37°C ont été remis à des températures contrôles de 27°C pendant 4 à 6 mois supplémentaires et sexés afin de vérifier si la stérilité était permanente ou non.

Pour chacune des descendance XX et XY, les troncs éviscérés sans nageoire ni queue ($n = 6$ à 8) ont été prélevés à 4, 7 et 15 jours de traitement (DT, days of the treatment) et les gonades ($n = 6$) ont été prélevées à 30DT pour les analyses moléculaires. Les gonades des poissons ($n = 6$ à 8) ont été prélevées au moment du sexage, 4 à 6 mois après la fin du traitement (MAT, month after the end of the treatment) et fixées dans du paraformaldéhyde à 4% (w/v) (PFA) pour les analyses histologiques, immunohistochimiques et TUNEL.

1.2. Traitements températures des juvéniles

En parallèle, trois descendance (XX, XY et XX/XY) au stade juvénile (110 dpf) ont été traitées à 37°C pendant 60 jours. A 110 dpf, les poissons de chaque descendance ont été divisés en deux groupes, le groupe témoin élevé à 27°C (Juv-27°C) et le groupe traité à la

température de 37°C (Juv-37°C). A la fin du traitement, les individus traités ont été remis à des températures contrôles de 27°C pendant 2 mois avant de procéder au sexage (2MAT) pour vérifier si la stérilité était permanente ou non.

Les gonades des femelles (XX) ont été prélevées à la fin du traitement de 60 jours (60DT) et au moment du sexage, 2 mois après la fin du traitement (2MAT), pour les analyses moléculaires, histologiques, immunohistochimiques et TUNEL. Les gonades des individus des descendance mâle (XY) et mixte (XX/XY) ont aussi été prélevées à 60 DT et à 2MAT pour les analyses moléculaires et seulement à 2MAT pour les analyses histologiques, immunohistochimiques et TUNEL. Lors de chaque prélèvement, 6 à 8 gonades des 2 groupes, témoins à 27°C et traités à 37°C ont été stockées dans du RNA later (Sigma) à -20°C pour les futures analyses moléculaires. 4 gonades ont été également fixées dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4% et stockées à 4°C pour les analyses histologiques, immunohistochimiques et TUNEL.

1.3. Traitements au busulfan sur des alevins et des juvéniles

La molécule de busulfan (B2635-25G, Sigma) a été utilisée pour étudier l'induction de la stérilité par un agent chimique. Des expérimentations avec deux modes d'administration du busulfan ont été menées :

- par injection intra-péritonéale d'une dose de 40 mg de busulfan/kg de poids corporel de poissons, sur des juvéniles de 55 dpf provenant d'une descendance mixte (XX/XY).
- par l'aliment à 3 doses différentes de 40, 80 et 160 mg de busulfan/kg d'aliment, sur des alevins âgés de 10 dpf, provenant de descendance monosexes femelles (XX) et mâles (XY).

1.3.1. Administration par injection intra-péritonéale à la dose de 40 mg de busulfan/kg de poids vif

Des juvéniles âgés de 55 dpf provenant d'une descendance mixte XX/XY ont été utilisés. Nous avons injecté 200 poissons de 2g, soit un total de 400g de poids vif. Nos poissons devant recevoir une injection intra-péritonéale de busulfan à une concentration de 40 mg de busulfan par kg de poids vif, il a été nécessaire de peser 16 mg de busulfan. 100 µl de solution liquide contenant le busulfan (0,1 ml) ont été injectés par poisson soit un volume total de 20

ml pour 200 poissons. Le busulfan a du, au préalable, être dilué dans du DMSO à une concentration de 4 mg/ml sinon il précipite. Nous avons pesé 16 mg de busulfan que nous avons dilué dans 4 ml de DMSO. Après avoir préparé la solution de Ringer (NaCl, FW = 58,44 ; KCL, FW = 74,55 ; CaCl₂, FW = 147,02 ; MgCl₂, FW = 95,21 ; Glucose, FW = 180,2 ; Hepes en solution liquide à 238,2 m/ml). Nous avons ajouté 16 ml de solution de Ringer à la solution busulfan/DMSO pour arriver à un volume total de 20 ml. En parallèle, le groupe de 200 poissons Placebo a été injecté avec une solution de DMSO/Ringer dans les mêmes proportions que le groupe ayant subi l'injection de busulfan (volume total de 20 ml, avec 4 ml de DMSO et 16 ml de solution de Ringer). Les poissons ont été anesthésiés avant de recevoir l'injection intra-péritonéale de busulfan ou de la solution Placebo. Ils ont ensuite été mis dans un seau avec oxygénation jusqu'à leur réveil, puis remis dans leur bac respectif.

Seuls des prélèvements gonadiques pour les analyses histologiques ont été effectués, 30 jours après l'injection (J30 - 85 dpf) et 60 jours après l'injection (J60 - 115 dpf).

1.3.2. Administration par incorporation à l'alimentation aux doses de 40-80-160 mg busulfan/Kg d'aliment

Pour les alevins des descendance XX et XY, les troncs des groupes témoins 27°C et busulfan ont été prélevés à 7DT et 14DT pour les analyses d'expression, et les gonades ont été prélevées à 30DT, à la fin des 60 jours de traitement (60DT) ou 30 jours après la fin du traitement (90 DT). 6 à 8 gonades ont été conservées pour les analyses d'expression et 4 gonades ont été conservées pour les analyses histologiques, immunohistochimiques et TUNEL.

Les individus de ces différentes expérimentations ont été sexés entre 4 et 5 mois après la fin du traitement.

1.4. Sexage

Au moment du sexage, les paramètres suivants ont été utilisés afin de comparer les groupes 27°C et 37°C, que ce soit au stade alevin (10 dpf) ou juvénile (110 dpf) : le phénotype gonadique (sex-ratio) basé sur la visualisation de la macroscopie gonadique, le rapport gonado-somatique et le taux de survie.

Le rapport gonado-somatique ou RGS se calcule par la formule suivante :

$$(poids\ gonades * 100) / poids\ corporel.$$

2. Extraction des ARN totaux, traitement DNase et Reverse transcription

2.1. Extraction des ARN totaux

Les troncs et les gonades ont été homogénéisés à l'aide de l'Ultra-Turax T10 de chez IKA. Les ARN totaux (ARNt) ont été extraits des gonades en utilisant le réactif TRIzol (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), selon les préconisations du fabricant. Les culots d'ARNt ont ensuite été repris dans des volumes variés d'eau RNase-free, de 20 à 50 µl, selon la taille de ce culot. Chaque échantillon d'ARNt a été quantifié avec un nanodrop (spectrophotométrie, BioWaveII, WPA, Cambridge, UK) et leur intégrité a été évaluée par migration sur gel d'agarose à 1%.

2.2. Traitement DNase et Reverse transcription.

Pour éliminer tout résidu possible d'ADN génomique (ADNg), 2 µg d'ARNt ont été traités, par une incubation de 30 min à 37°C, avec 0.5 U de TURBO DNase (Ambion, Austin, TX, USA). L'action de la DNase a été stoppée par ajout d'EDTA à une concentration finale de 5 mM suivie d'une incubation de 10 min à 75°C. Le premier brin d'ADN complémentaire (ADNc) a ensuite été synthétisé, en suivant les recommandations du fabricant, avec un mix contenant la reverse transcriptase SuperScript™, les oligo(dT) 12-18 primers et la RNAaseOUT (Invitrogen, Karlsruhe, Allemagne), à 42°C pendant 60 min. Puis, la réaction a été stoppée par chauffage à 70°C pendant 15 min. L'ADNc a été dilué dans de l'eau RNase-free à 20 ng/µl pour les analyses de quantification.

2.3. PCR quantitative en temps réel ou qPCR.

Je me suis intéressée au profil d'expression de trois gènes marqueurs de types cellulaires gonadiques, également impliqués dans la différenciation du sexe et pouvant être modulés par les traitements à la température, mais aussi par le busulfan :

- *vasa* ou DDX4/MHV : marqueur des cellules germinales précoces chez les mâles et les femelles ;
- l'aromatase gonadique (*cyp19a1*) : marqueur des cellules de la *granulosa* chez les femelles et gène clé de la différenciation ovarienne ;

- l'hormone anti-müllerienne (*amh*) : marqueur des cellules de *Sertoli* chez les mâles et gène clé de la différenciation testiculaire.

L'elongation factor 1 (*efl*), ayant une expression stable et constante dans le temps, quelles que soient les conditions environnementales ou expérimentales, a été choisi comme gène de référence (ajouter ref biblio récente chez poisson si possible)

La quantification des transcrits a été réalisée par PCR en temps réel en utilisant le système "Stratagene MX3000P QPCR" (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Les amorces ont été désignées par Primer3 plus et synthétisées par Eurogentec (Eurogentec, Seraing, Belgique). La température d'hybridation des amorces (T_m) est de 60°C pour les trois premiers gènes et de 62°C pour le gène *vasa*.

Gène	Amorces forward (5' → 3')	Amorces reverse (5' → 3')
<i>amh</i>	F358 : CCACAGTAACCGAGTACTCAC	R640 : GAACCAAACCTGCTGTTTGTTCAG
<i>cyp19a1a</i>	F1462 : CTACTTTCAGCCGTTTCGGTTCAG	R1744 : GTTCGGGTCTCGGAGGGTTTG
<i>efl</i>	F1014 : AGAACGTCTCCGTCAAGGAAAT	R1115: GATGATGACCTGAGCGTTGAAG
<i>vasa</i>	F1072 : AGTTGCTTCAGTGAGATG	R1223: AGTGCTGACTCCACCATA

Tableau 3. Amorces utilisées pour la PCR en temps réel.

Pour chaque échantillon, les réactions de PCR ont été réalisées avec 40 ng d'ADNc par puits et en duplicat, dans un volume de 10 µl contenant 300 nm de chaque primer ainsi que le kit "Brilliant II SYBR® Green QPCR master mix kit" (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Les paramètres du cycle sont : 95°C pendant 10 min, suivi de 40 cycles d'amplification à 95°C pendant 30 sec, T_m de 60°C ou 62°C pour 30 sec et 72°C pendant 30 sec. Ce cycle est suivi d'une dissociation à 95°C pendant 1 min, 55°C pendant 30 sec et 95°C pendant 30 sec pour vérifier qu'un produit unique a été obtenu. L'expression de tous les ADNc a été quantifiée simultanément pour un même gène. *Efl* a été utilisé comme gène de référence pour standardiser les niveaux d'expression. Pour chaque réaction qPCR, un contrôle négatif (ADNc remplacé par de l'eau), appelé NTC (None Template Control), a été amplifié. Le seuil de cycle (C_t) a été calculé par la moyenne de l'analyse des deux duplicats, réalisés pour chaque échantillon et pour chaque gène d'intérêt. Pour chaque gène, l'efficacité de l'amplification (E) a été calculée par rapport aux courbes standards de ce gène, réalisées sur une série de produits PCR dilués et calculées selon l'équation : $E = 10^{(-1/slope)}$.

Les quantités d'expression ont été calculées à partir d'une méthode de ΔCt modifiée (quantification relative). Cette méthode prend en considération l'efficacité des différentes réactions de PCR, exprimée comme "Expression de Normalisation Moyenne" (MNE) (Simon, 2003 ; Poonlaphdechaet *al.*, 2013), en utilisant le gène de référence ef1 pour permettre la normalisation des valeurs, calculée selon l'équation suivante :

$$MNE_{cible} = (E_{référence})^{Ct_{référence}} / (E_{cible})^{Ct_{cible}}.$$

Les quantités d'expressions relatives ont ensuite été exprimées en valeur de % maximum de MNE :

$$\% \text{ maximum MNE} = (MNE_{cible} \times 100) / MNE_{maximum}.$$

3. Analyse histologique des gonades

Les gonades (n = 4 à 6 selon les traitements) ont été fixées une nuit à 4°C dans du paraformaldéhyde à 4% (w/v), déshydratées dans des bains successifs d'alcool et incluses en paraffine. Les blocs ont ensuite été sectionnés à 4µm, à la parallèle ou à la transversale de l'axe gonadique. Quatre lames par poissons, contenant deux à six coupes, ont été sélectionnées. Une lame a été marquée à l'hématoxyline-éosine pour l'observation des tissus gonadiques et le reste des lames a été utilisé en immunohistochimie et essai TUNEL.

4. Analyses immunohistochimiques des protéines

Vasa et PCNA

4.1. Protocole élaboré sur la plateforme PHIV du CIRAD

Pour détecter les cellules germinales, nous avons utilisé un anticorps lapin anti-VASA DDX4/MVH (ab13840, abcam, Cambridge, UK) (un marqueur des cellules germinales primordiales), dilué au 1:200.

Après déparaffinage et réhydratation, les coupes ont été déprotéinées avec 0,1% de trypsine (m/v) (Sigma) pendant 10 min à 37°C. Après 2 rinçages de 5 min dans le tampon PBST (0,05% de Tween 20, phosphate buffered saline, pH 7,2), les lames ont été incubées dans le tampon de blocage à 1% (Roche) pendant 1 heure à température ambiante. Les coupes ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire dilué dans le tampon de blocage à 1%, une nuit à 4°C. Après 3 rinçages de 5 min dans le PBST, les coupes ont été incubées 2 h à 4°C avec un

anticorps secondaire anti-lapin couplé à la phosphatase alcaline dilué au 1:100. Celles-ci ont ensuite été rincées 2 fois pendant 5 mn dans du PBST. Puis les lames ont été incubées 15 min dans la solution de Vector Blue contenant 5 mM de levamisol pour la révélation phosphatase. Les lames ont à nouveau été rincées dans du PBST et incubées avec le DAPI dilué à 1:1000 pendant 5 min. Par la suite, les lames ont été rincées 10 min dans de l'eau et montées avec la solution de Citifluor MWL 4-88 (Citifluor Limited, Londres, UK). Pour les contrôles négatifs, l'anticorps primaire a été remplacé par du sérum de lapin.

4.2. Protocole élaboré par Histalim

Pour détecter les cellules germinales, l'anticorps lapin anti-VASA-DDX4/MVH (GTX128306, GeneTex, USA), qui réagit spécifiquement avec les tissus gonadiques de poisson-zèbre et de médaka, a été utilisé. Après blocage avec la protéinase K pendant 4 min, les lames ont été incubées 1 heure dans l'anticorps primaire dilué au 1:200.

La prolifération cellulaire a été visualisée avec l'anticorps de souris anti proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (M0879, DakoCytomation, Denmark) dilué au 1:5000 et incubé 1 heure après une étape de blocage avec CC1 (Roche).

Les lames sont ensuite incubées 1 heure avec des anticorps secondaires couplés aux peroxydases, anti-lapin pour détecter la présence de Vasa et anti-souris pour détecter la présence du PCNA. Les incubations sont réalisées en utilisant l'automate Benchmark (Roche-Ventana). Le signal est révélé avec le DAB (Ultraview) donnant un marquage marron. Une contre coloration à l'hématoxyline a été réalisée pour visualiser les noyaux (marquage bleu).

5. Essai TUNEL

La Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling ou TUNEL est une méthode employée pour détecter la fragmentation de l'ADN qui résulte de l'activation des cascades des voies de signalisation apoptotiques. Cet essai repose sur la présence d'encoches au niveau de l'ADN qui peuvent être identifiées par la terminal deoxynucleotidyl transferase ou Tdt, une enzyme qui catalyse l'ajout de dUTPs qui seront couplés secondairement à un marqueur.

Les coupes ont été déparaffinées, réhydratées dans du PBS et perméabilisées par une incubation de 11 min avec 20 µg/µl de Protéinase K, à température ambiante. Chaque essai

TUNEL a inclu un contrôle positif, consistant à traiter un échantillon à la DNase afin de fragmenter l'ADN, et un contrôle négatif consistant à remplacer l'enzyme transférase terminal déoxynucleotydyl par de l'eau dans le mix de réaction TUNEL. L'apoptose gonadique a été analysée par essai TUNEL en utilisant deux kits différents commercialisés : le TUNEL Colorimétrique DeadEnd TM (Promega) et l'In Situ CellDeath POD (Roche). Les lames ont été montées avec la solution de Citifluor MWL 4-88 (Citifluor Limited, Londres, UK).

5.1. Protocole élaboré sur la plateforme PHIV

Le degré de fragmentation de l'ADN dans les cellules gonadiques de tilapia a été quantifié en utilisant le système "TUNEL Colorimétrique DeadEnd TM disponible dans le commerce (Promega). Le marquage TUNEL a été réalisé selon le protocole du fabricant.

5.2. Protocole élaboré par Histalim

Le système In Situ CellDeath POD (Roche) a été utilisé pour quantifier le degré de fragmentation de l'ADN dans les gonades de tilapia. Le marquage TUNEL a été réalisé suivant les recommandations du fabricant.

6. Acquisition d'images et comptage cellulaire

6.1. Auprès de la Plateforme PHIV du CIRAD

Les lames d'immunohistochimie de la protéine Vasa et du TUNEL ont été visualisées avec le microscope DM4500 de chez Leica. L'acquisition des images a été faite au grossissement 40x, avec la caméra Retiga 2000R (q imaging) et le logiciel d'acquisition Volocity (Perkin Elmer). Les images ont ensuite été analysées par les logiciels Image J et Roi Manager.

Avec l'anticorps VASA, nous avons détecté trois intensités de marquage cellulaire (marquage bleu) : un signal fort (type I) présent au niveau des spermatogonies, intermédiaire (type II) présent au niveau des spermatocytes I et des cellules ne montrant aucun signal (type III - spermatides, spermatozoïdes). Le nombre de cellules totales présentes sur l'image sera donné par le nombre de cellules positives DAPI (fluorescence bleue). Le résultat sera donné par :

$$\% \text{ marquage} = (\text{nombre cellules positives (type I et II)} * 100) / \text{nombre de cellules totales}$$

En ce qui concerne le TUNEL, une interférence entre le marquage TUNEL et le marquage DAPI a été observé ; les cellules dont l'ADN est fragmenté sont positives au TUNEL, mais non marquées au DAPI. Le résultat sera donc donné par :

$$\% \text{ de surface marquée} = (\text{surface brune } (\mu\text{m}^2) * 100) / \text{surface totale } (\mu\text{m}^2)$$

Au grossissement 40, la caméra prend une image de 1600x1200 pixels soit un total d'1900000 pixels et 1 pixel correspond à une surface de 0,0335 μm^2 .

6.2. Au près de la société Histalim

Les lames ont été scannées en utilisant le Nanozoomer 2.0 HT (Hamamatsu), en fond clair sans Z-stack, au grossissement 20x. Les images ont été visualisées avec le logiciel NDPview 2. Elles ont ensuite été analysées en utilisant le logiciel CellsCounter. La surface de chaque marquage a été quantifiée en utilisant l'algorithme Watersheed développé et validé par la société Histalim (Montpellier), permettant de calculer la surface du marquage et la surface du tissu. Chaque image est segmentée en sections homogènes avec l'algorithme et :

$$\% \text{ de surface marquée} = (\text{surface brune } (\mu\text{m}^2) * 100) / \text{surface totale } (\mu\text{m}^2).$$

7. Analyses statistiques

Les données expressionnelles et histologiques sont représentées comme la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (SEM) pour chaque échantillon de chaque groupe. Compte tenu de la faible taille des échantillons, $n < 10$, nous avons choisi d'utiliser les tests non paramétriques. La différence significative est analysée par le test de Mann-Whitney pour comparer 2 échantillons non appariés et Kruskal-Wallis pour comparer 3 échantillons ou plus non appariés en utilisant le logiciel GraphPad Prism. Les différences sont considérées comme statistiquement significatives à $P \leq 0,005$.

Au moment des sexages, le test anova du logiciel GraphPad Prism a été utilisé pour chercher les différences entre les groupes de sex-ratio. Les différences sont considérées comme statistiquement significatives à $P \leq 0,005$. Le test Chi-square a été employé pour comparer les taux de survie entre les groupes contrôles à 27°C et traités à 37°C. Les différences sont considérées comme statistiquement significatives à $P \leq 0,005$.

Partie 3 : Résultats expérimentaux

Chapitre 1: Effets des températures stérilisantes sur les gonades femelles de tilapias du Nil, avant la différenciation et lors de la maturation sexuelle

Ce travail a été mené en trois étapes. La première étape a consisté, avec l'appui de données de la littérature (Thomé *et al.*, 2012), en une description exhaustive des types cellulaires germinaux et somatiques contenus dans les ovaires de femelles tilapias du Nil contrôlés élevés à 27°C. La deuxième partie regroupe les résultats des effets d'une forte température stérilisante de 37°C sur le développement gonadique ovarien et cette étude a donné lieu à la soumission d'un article dans la revue *Molecular Reproduction and Development*.

1. Description des types cellulaires ovariens chez le tilapia du Nil

1.1. Structure de l'ovaire

Les ovaires matures de tilapia du Nil sont des organes pairs qui ont une localisation péritonéale comme les testicules. Ils ont aussi une forme allongée, mais sont beaucoup plus volumineux que la gonade mâle. L'ovaire est constitué de tissus formant des lamelles ovigères (Lame ovigère - **Figure 24**) dans lesquelles se développent des ovocytes et, contrairement aux mammifères, l'ovaire des poissons téléostéens contiendrait un stock d'ovogonies indifférenciées, pouvant être renouvelé par divisions mitotiques, tout au long de la vie des individus. Les ovaires de tilapia sont asynchrones, c'est-à-dire qu'ils présentent, sans qu'il y ait une population qui domine, des ovocytes à tous les stades de différenciation : ovogonies, ovocytes pré-méiotiques, follicules prévitellogéniques, follicules vitellogéniques, follicules post-ovulatoires, follicules atrétiques.

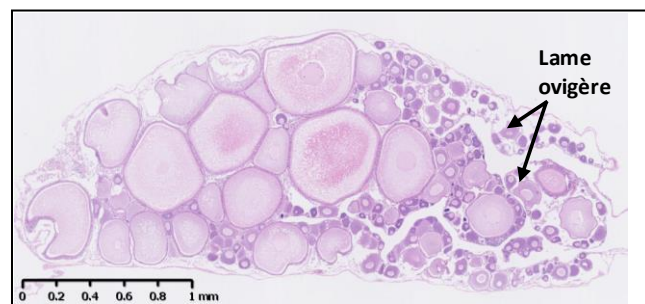


Figure 24. Structure ovarienne lors de la maturation sexuelle de femelle tilapia du Nil.

1.2. Types cellulaires germinaux

Les **ovogonies** (**Oo** - **Figure 25**) constituent le stock des cellules germinales chez la femelle. Elles ont une forme circulaire, avec un cytoplasme clair et un gros noyau. Ce sont les plus petites cellules germinales observées dans l'ovaire avec un diamètre moyen de 42 μm . Ces cellules sont souvent observées en amas, et à proximité sont retrouvées quelques cellules pré-folliculaires. L'ovogenèse va débiter avec l'entrée en méiose de ces cellules germinales, qui vont ensuite stopper leur progression en prophase I et constituer des cystes **d'ovocytes pré-méiotiques** (**OvI** - **Figure 25**).

Les **ovocytes péri-nucléaires I et II (PN1 et PN2 - Figure 25)** sont caractérisés par un ovocyte en position centrale et l'augmentation du volume du cytoplasme autour, avec un diamètre moyen de 129 μm pour les PN1 et de 264 μm pour les PN2.

Les **follicules prévitellogéniques (PVF - Figure 25)** sont constitués en position centrale d'un ovocyte entouré de son enveloppe vitelline, elle-même entourée d'une monocouche de cellules épithéliales, nourricières de l'ovocyte, appelée la **granulosa**. Les cellules de la granulosa sont ensuite progressivement entourées de plusieurs couches cellulaires appelé la **thèque** et sont séparées de celle-ci par la membrane basale. Le diamètre continue à augmenter avec une moyenne de 497 μm .

Les **follicules vitellogéniques (VF - Figure 25)** sont caractérisés par une accumulation de **vitellogénine**, une lipoprotéine synthétisée par le foie. Le vitellus servira ensuite de source nourricière pour le futur zygote si la fécondation a lieu. A la fin de la phase de vitellogenèse, durant la maturation ovocytaire, le noyau de l'ovocyte, encore appelé vésicule germinative, migre vers le pôle animal, pour se positionner sous le micropyle (par lequel pénétrera le spermatozoïde lors de la fécondation), et reprend la méiose jusqu'à la métaphase de deuxième division méiotique. Le diamètre moyen est plus important (548 μm).

Les **follicules post-ovulatoires** sont déformés car ils n'entourent plus les ovocytes qui ont été expulsés des follicules dans la lumière ovarienne, lors du processus d'ovulation.

Les **follicules atrétiques (AT - Figure 26)** sont soit des follicules très volumineux, impactés par des facteurs internes (physiologiques) ou externes (physiques ou environnementaux) n'arrivant pas à maturité, soit des follicules qui dégénèrent après ovulation. Cette atrésie entraîne la phagocytose des follicules.

Les ovocytes en différenciation voient leur diamètre cellulaire moyen augmenter continuellement (**Tableau 4**):

Catégorie d'ovocytes du moins au plus différenciés	Diamètre moyen	Tableau 4 représentant le diamètre cellulaire moyen des ovocytes en différenciation dans un ovaire mature de tilapia du Nil.
Ovogonies	42 μ m	
Ovocyte pré-méiotique	74 μ m	
Ovocyte péri-nucléaire 1	129 μ m	
Ovocyte péri-nucléaire 2	264 μ m	
Ovocyte prévitellogénique	497 μ m	
Ovocyte vitellogénique	548 μ m	
Ovocyte atrétique	1,44 mm	

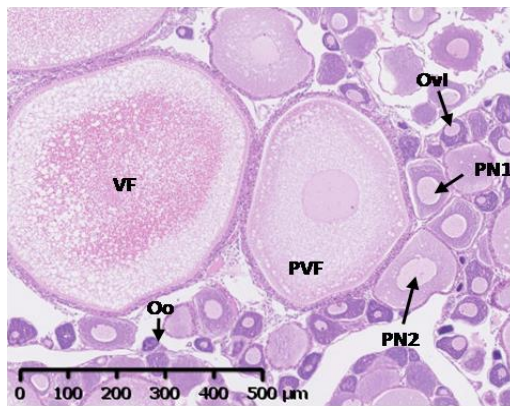


Figure 25. Coupe ovarienne montrant les cellules germinales femelles à différents stades de différenciation. Oo: ovogonies, OvI: ovocyte I, PN1: ovocytes péri-nucléaires 1, PN2 : ovocytes péri-nucléaires 2, PVF: ovocytes prévitellogéniques et VF: ovocytes vitellogéniques.

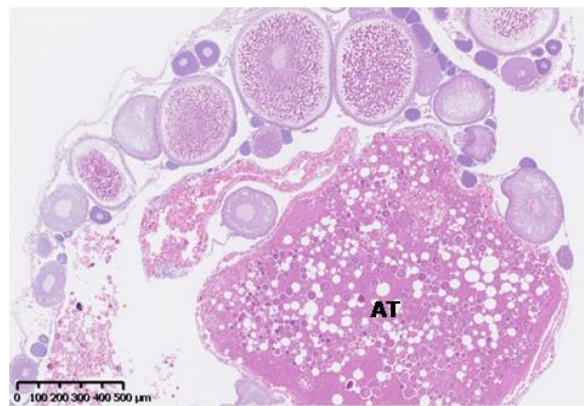


Figure 26. Coupe ovarienne présentant un follicule atrétique (AT).

1.3. Types cellulaires somatiques

Les **cellules folliculaires de la granulosa (FC - Figure 27)** sont les cellules nourricières de l'ovocyte. A partir du stade de différenciation d'ovocyte prévitellogénique, ces cellules somatiques s'associent en couche pour entourer l'ovocyte.

Les **cellules de la thèque (Th)** sont des petites cellules circulaires avec un gros noyau et un cytoplasme abondant. Ces cellules sont associées entre-elles et entourent progressivement les cellules de la granulosa. Elles sont le siège d'une stéroïdogénèse active.

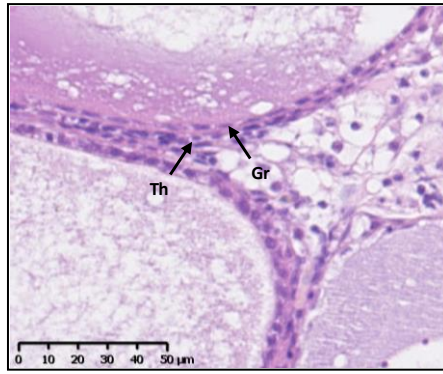


Figure 27. Coupe ovarienne montrant des cellules somatiques folliculaires de la granulosa (Gr) et de la thèque (Th).

2. Article 1 : Etudes des mécanismes cellulaires et moléculaires d'une stérilisation induite par une haute température chez les femelles tilapia du Nil

2.1. Contexte, objectifs de l'étude et questions posées

La production de poissons stériles serait une bonne alternative pour surmonter les inconvénients de la reproduction intempestive des espèces d'intérêt piscicole, mais aussi comme moyen de confinement des poissons domestiques. Les poissons cultivés stériles éviteraient les flux de gènes des souches domestiques vers les populations sauvages (Thorstad *et al.*, 2008 ; Glover *et al.*, 2013).

Un stress thermique peut induire la stérilité en perturbant la spermatogenèse chez les mammifères (Yin *et al.*, 1997 ; Rockett *et al.*, 2001 ; Bedford, 2015) et chez les volailles (Karaca *et al.*, 2002). Chez plusieurs espèces de poissons, il a aussi été démontré que des traitements à haute température peuvent provoquer la dégénérescence des cellules germinales. Chez le pejerrey, espèce à déterminisme du sexe dépendant de la température, les hautes températures seules (Strüsmann *et al.*, 1998) ou couplées au busulfan (Madjhi *et al.*, 2008) induisent la perte des cellules germinales par apoptose sans affecter le sex-ratio des gonades stériles (Ito *et al.*, 2008a, b). Une déplétion des cellules germinales par les hautes températures est aussi visible chez le fugu (Lee *et al.*, 2009) et le poisson-zèbre (Uchida *et al.*, 2004), deux espèces chez lesquelles le sexe n'est pas contrôlé par la température. Par ailleurs, on peut aussi s'interroger sur les possibles effets du réchauffement

climatique sur la fertilité des populations de poissons sauvages. En effet, les années où les températures sont les plus chaudes, la fertilité des populations sauvages de pejerreys est affectée. Les gonades de ces individus montrent une déplétion en cellules germinales qui ressemble à celle trouvée en laboratoire sur des poissons traités à haute température (Ito *et al.*, 2008).

Le tilapia du Nil, parce qu'il est une espèce d'intérêt économique aquacole et parce que son déterminisme du sexe est dépendant de la température, pourrait être un bon modèle d'étude de l'induction de la stérilité par les hautes températures. Il présente un avantage supplémentaire : par la production de descendance génétiquement 100% femelles (XX) ou 100% mâles (XY), il est possible d'analyser les effets d'un traitement d'induction de stérilisation par les hautes températures sur chacun des sexes. Récemment, Pandit *et al.* (2015), ont démontré que la stérilisation induite par les températures de 37°C était permanente chez les femelles tilapias du Nil de souche Chitralada, quelque soit le stade de vie. Or contrairement à toutes les autres souches étudiées, la souche Chitralada n'est pas thermosensible (les fortes températures appliquées précocement ne sont pas masculinisantes). Considérant la thermosensibilité inter-famille/souche qui existe chez cette espèce, il était alors intéressant d'étudier si cette stérilisation est aussi présente et pérenne chez les souches Bouaké et Manzala dont nous disposons au laboratoire et qui sont toutes les deux thermosensibles.

La présente étude a porté sur :

- L'optimisation de la durée du traitement stérilisant à 37°C. Les pourcentages de stérilisation partielle ou complète des groupes femelles XX traités pendant 30 jours à 37°C seront comparés à ceux des groupes femelles XX traités pendant 60 jours à 37°C, provenant des descendance 100% femelles exposées aux températures stérilisantes de 37°C au stade alevins de 10 jours post-fécondation (dpf).
- L'étude des effets du traitement stérilisant de 37°C sur les gonades des femelles génétiques XX, traitées avant leur différenciation sexuelle : cette stérilisation est-elle complète et permanente ? L'analyse sera effectuée à différents niveaux (**Figure 29**) :
 - A l'échelle macroscopique : observation de la morphologie gonadique et des sex-ratios des différentes descendance lors du sexage 4 mois après la fin du traitement (4 MAT).

- A l'échelle cellulaire : visualisation de la structure cellulaire des gonades par histologie classique et confirmation de la perte des cellules germinales par immunohistochimie de la protéine vasa et comptage cellulaire de ce marquage.
- A l'échelle moléculaire : comparaison du patron d'expression de gènes d'intérêts marqueurs des cellules germinales *vasa* ou impliqués dans la différenciation gonadique mâle *amh* ou femelle *cyp19a1a* (aromatase gonadique) entre les femelles traitées à 37°C (XX-37°C) et les femelles témoins à 27°C (XX-27°C).
- L'étude des mécanismes pouvant être impliqués dans la disparition des cellules germinales dans les gonades des femelles traitées à 37°C. Sur la base des travaux de l'équipe et de la bibliographie, nous avons fait l'hypothèse (Baroiller *et al.*, 2009, **Figure 30**) que le nombre de cellules germinales pourrait constituer un seuil critique conduisant à la différenciation mâle (peu de cellules germinales) ou femelle (beaucoup de cellules germinales). Dès lors, les effets de la masculinisation induite par de fortes températures pourraient être provoqués par une diminution du nombre de cellules germinales par apoptose tandis que les très hautes températures pourraient promouvoir une stérilisation gonadique avec la mort de toutes les cellules germinales. La balance apoptose/prolifération cellulaire est donc à prendre en compte. L'analyse du taux d'apoptose est réalisée par essai TUNEL et celle de la prolifération cellulaire par immunohistochimie et comptage cellulaire du PCNA (proliferating cell nuclear antigen).
- Les cellules germinales sont sensibles à un traitement stérilisant à des stades précoces, avant la différenciation sexuelle, mais le sont-elles aussi à des stades plus tardifs, pendant la maturation sexuelle ? Pour répondre à cette question nous avons étudié les effets d'un traitement stérilisant de 37°C sur les gonades de femelles génétiques XX juvéniles, âgées de 110 dpf.
- Enfin, quels sont les effets du traitement à haute température sur la viabilité et la fonctionnalité des cellules somatiques ?

2.2. Résultats majeurs

- Les gonades des femelles des groupes Fry-27°C et Juv-27°C présentent toutes différents stades d'ovogenèse avec des individus en prévitellogénèse 1 lorsque peu d'ovocytes sont présents (**Figure 31 A**), en prévitellogénèse 2, caractérisée par un

grand nombre de petits ovocytes (**Figure 31 B**) et en vitellogenèse quand la gonade contient un grand nombre de gros ovocytes (**Figure 31 C**). A la différence, seulement 5% des groupes femelles traitées à 37°C pendant 60 jours (Fry-37°C et Juv-37°C) montrent des ovaires d'apparence normale.

- Différents types de stérilisation sont observés chez les Fry-37°C, avec une plus grande proportion de gonades affectées chez les groupes traités pendant 60 jours par rapport à 30 jours.
- Pour les groupes Fry-37°C traités pendant 60 jours, un grand pourcentage de gonades affectées (50 à 85%) est d'apparence extrêmement petite et fine, de type "string-like" (STL, **Figure 31 D**) tandis que d'autres (25%) sont translucides (TSL, **Figure 31 E,F**) et les dernières (5 à 10%) présentent une stérilisation partielle (PSG, **Figure 31 G**).
- Pour les Juv-37°C, des morphologies gonadiques similaires à celles observées chez Fry-37°C sont visibles. De plus, toutes les gonades traitées ont un GSI (index gonadosomatique) affecté par le traitement à 37°C. Ceci est confirmé par une réduction de 3 fois la taille des ovaires contrôles chez les gonades affectées par le traitement.
- Même si des descendance génétiquement monosexes femelles ont été produites à partir de néomâles XX, des mâles phénotypiques sont quand même trouvés dans les groupes Fry-27°C (7% de mâles pour la descendance Manzala P2 et 35% de mâles pour la descendance Bouaké P1) ; la présence de ces mâles phénotypiques résulte d'un déterminisme du sexe complexe comme déjà décrit précédemment (Baroiller *et al.*, 2009). La proportion de mâle augmente chez 4 des 5 descendance analysées, à la fois aux stades alevin et juvénile et cette différence est significative chez 2 des descendance (p<0.0001 ; **Tableau 5**).
- Nous avons confirmé par histologie que les individus contrôles Fry-27°C et Juv-27°C ont des ovaires normaux lors des sexages, présentant une cavité ovarienne et des ovocytes à des stades différents de développement : ovogonies, ovocytes péri-nucléaires 1 et 2 (PN1 et PN2), ovocytes prévitellogéniques (PVF) et ovocytes vitellogéniques (VF). Des cellules somatiques de la granulosa et de la thèque sont visibles au niveau des follicules (**Figure 32 A,B**).
- Au contraire, les gonades TSL et STL affectées par le traitement 37°C chez les Fry-27°C sont anormales avec une structure cellulaire complètement désorganisée et elles apparaissent dépourvues de cellules germinales (**Figure 32 C-G**). Beaucoup de ces

gonades présentent une cavité ovarienne (**Figure 32 C,D**) et des lames ovigères contenant quelques cellules somatiques. Ces dernières ressemblent histologiquement à des cellules productrices de stéroïdes. D'autres gonades paraissent avoir des structures "lobule-like", ressemblant à des testicules avec des canaux "efferent-like" et des cellules "Leydig-like" (**Figure 32 E,F et Figure 33 A,B**).

- Les gonades partiellement stérilisées des groupes Fry-37°C ont deux parties bien distinctes, l'une ressemblant à un ovaire (**Figure 33 C**) et l'autre à une structure testiculaire, avec des cystes apparents dépourvus de cellules germinales et entourés par de nombreuses cellules de Leydig (**Figure 33 A,B**).
- Les individus Juv-37°C ont aussi des ovaires anormaux, avec absence partielle ou totale des cellules germinales. Dans ce dernier cas de figure, des follicules atrétiques et des cellulaires folliculaires d'apparence intacte, ainsi que du matériel ressemblant à des résidus phagocytaires sont visibles (**Figure 33 E**).
- Dans les gonades affectées STL et TSL par le traitement à 37°C, l'absence de marquage Vasa (marqueur cellules germinales primordiales) confirme la déplétion massive des cellules germinales dans ces gonades (**Figure 34 B,C,D**). Ce constat est confirmé par les quantifications cellulaires. Chez la descendance P3, 4.6% \pm 2.5% ($p < 0,0001$) de cellules positives à Vasa sont observés pour les gonades TSL, 8.1% \pm 1.5% ($p < 0,0001$) pour les gonades TSL comparé à 86.83% pour les gonades Fry-27°C (**Figure 34 G**).
- Il n'y a pas de différence significative du pourcentage de marquage PCNA (marqueur cellules mitotiques) entre les gonades stériles STL et TSL et les gonades contrôles à 27°C. Par contre, une augmentation de ce marquage est visible dans les gonades partiellement stériles suggérant une augmentation de la prolifération cellulaire (**Figure 35 F**, $p < 0,05$).
- Le traitement température a provoqué l'augmentation significative de l'apoptose cellulaire dans les gonades stériles STL et TSL par rapport aux gonades contrôles à 27°C, à la fois chez les alevins, mais aussi chez les juvéniles (**Figure 36**).
- Le profil d'expression du gène *vasa* a confirmé la dégénérescence des cellules germinales à la fin du traitement dans le groupe Juv-37°C qui présente un taux de transcrits *vasa* significativement plus bas (1.49 ± 0.8 , $p < 0.05$) comparé à celui trouvé chez les Juv-27°C (16.94 ± 3.5) (**Figure 38A**).

2.3. Discussion

Dans cette étude nous avons utilisé la température de 37°C pour éliminer les cellules germinales chez les femelles tilapias du Nil. Nous avons analysé les effets sur les sex-ratios et les mécanismes pouvant induire cette déplétion à l'aide de marqueurs spécifiques (anticorps ou gènes). Notre travail a montré que les traitements à 37°C affectent la structure gonadique, provoquant une perte partielle ou totale des cellules germinales et par conséquent entraînant la stérilisation de ces gonades. Les traitements à 37°C sur des alevins initiés à 10 jours post-fécondation (dpf) sont plus efficaces quand ils sont appliqués pendant une durée de 60 jours, induisant alors la disparition complète des cellules germinales chez près de 85% des poissons. Cette stérilité induite est permanente avec une absence de recolonisation des cellules germinales dans les gonades quatre mois après la fin du traitement. De plus, nous avons vérifié que les animaux étaient encore stériles à l'âge de 14 mois. Comme nous l'avions anticipé, l'induction de la stérilisation semble plus efficace à des stades précoces de développement, lorsque les gonades sont encore indifférenciées et qu'elles ne possèdent que 38 à 58 cellules germinales primordiales (CGP) (Baroiller, 1988 ; D'Cotta *et al.*, 2001), qu'à des stades plus tardifs lors de la première maturation sexuelle. En effet, chez les femelles juvéniles cette stérilisation semble alors incomplète et serait peut-être transitoire.

Deux récentes études font référence à un taux de 100% de stérilisation en réponse à un traitement à 37°C d'une durée minimale de 45 jours chez des femelles tilapias du Nil de souche Chitralada (Pandit *et al.*, 2015) et sur des mâles tilapias du Mozambique (Nakamura *et al.*, 2015). Contrairement à ces travaux, nous avons trouvé que les alevins présentent une forte variabilité individuelle de réponse aux traitements à la température de 37°C. Premièrement, tous les individus d'une même descendance ne sont pas stérilisés ou n'ont pas le même degré de déplétion des cellules germinales. Deuxièmement, nous avons trouvé différents phénotypes gonadiques stérilisés, montrant des différences de sensibilité à la chaleur des cellules germinales selon les individus. Le rétrécissement des gonades, apparaissant comme "string-like" ou translucides est toujours associé avec la stérilité. Ces gonades sont complètement dépourvues en cellules germinales et la déplétion sévère de ce type cellulaire est confirmée par immunolocalisation de la protéine Vasa et sa quantification. Nous avons aussi analysé les niveaux d'expression du gène vasa. De plus faibles taux de transcrits *vasa* dans les gonades 37°C, à la fois chez les alevins et chez les juvéniles, confortent à nouveau la déplétion des cellules germinales dans la plupart des gonades traitées à 37°C. La présence de gonades rétrécies, "string-like" ou translucides, est associée avec la

déplétion des cellules germinales qui a lieu par apoptose associée ou non à une réduction de la prolifération cellulaire. Et les analyses d'expression génique ont aussi démontré que les cellules somatiques sont affectées par le traitement 37°C d'induction de la stérilité.

Il est intéressant de noter que notre travail a aussi révélé une proportion de mâles augmentant avec le traitement 37°C. Cependant, nous ne pouvons pas exclure une mortalité liée au sexe induite par les traitements à hautes températures. Un taux de survie plus faible des femelles pourrait avoir un effet indirect sur le sex-ratio. Mais la macroscopie et les observations histologiques d'un certain nombre de gonades traitées ont mis en évidence des morphologies "testicule-like" et dans certains cas la présence d'ovotestis. Ces gonades semblent avoir des structures lobulaires avec des canaux "efferents-like" et des cellules de Leydig. De plus, une des gonades supposées stériles paraît présenter quelques spermatozoïdes. Il serait nécessaire de confirmer cette masculinisation par une meilleure détection à la fois des cellules somatiques productrices de stéroïdes et des cellules de support.

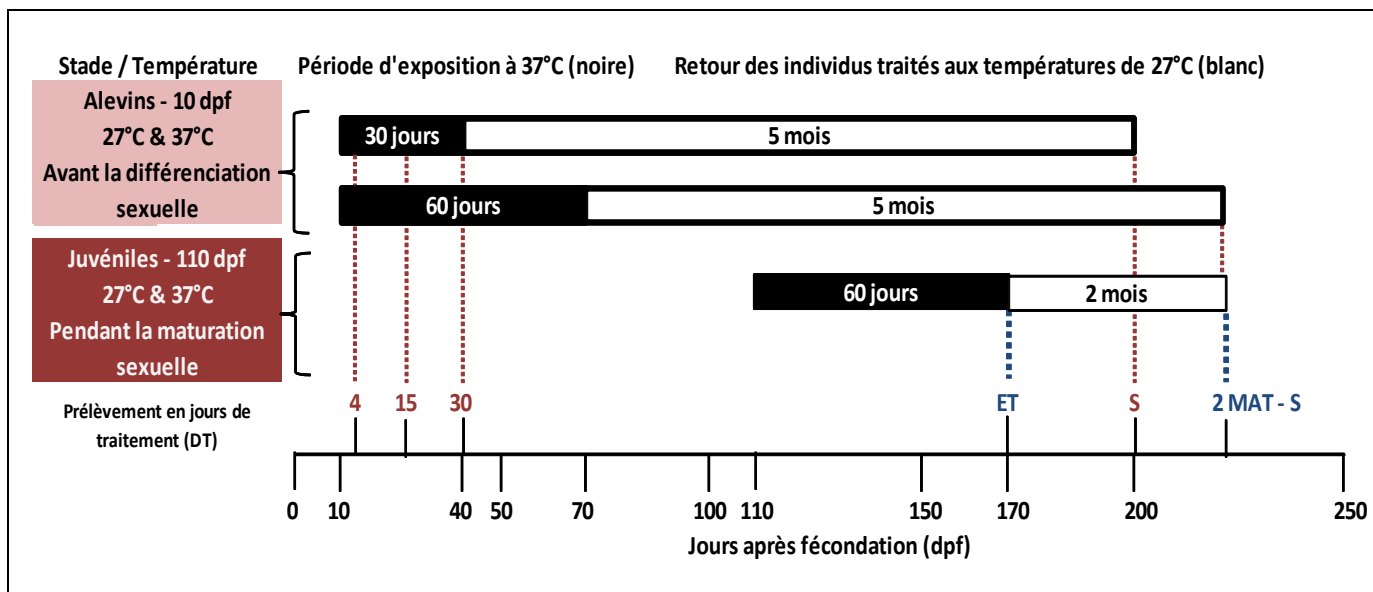


Figure 28. Diagramme schématisant les expérimentations aux fortes températures de 37°C sur des femelles génétiques XX tilapias du Nil alevins et juvéniles. DT : jour de prélèvement, ET: fin du traitement, MAT: mois après la fin du traitement, S: sexage.

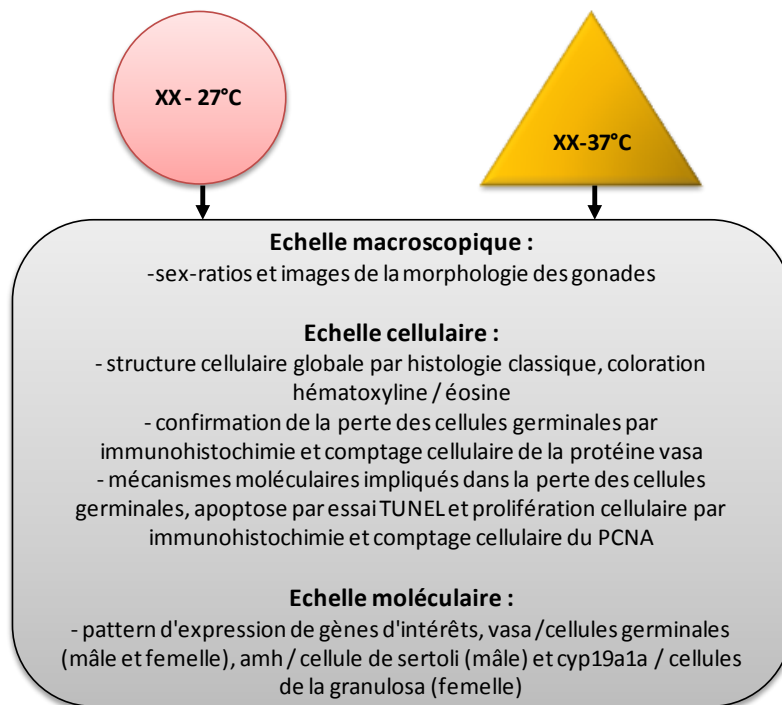


Figure 29. Etude de l'effet des traitements stérilisants de 37°C sur les gonades des femelles génétiques XX alevins et juvéniles de tilapias du Nil à différents niveaux et comparaisons des groupes traités XX-37°C avec les groupes témoins XX-27°C

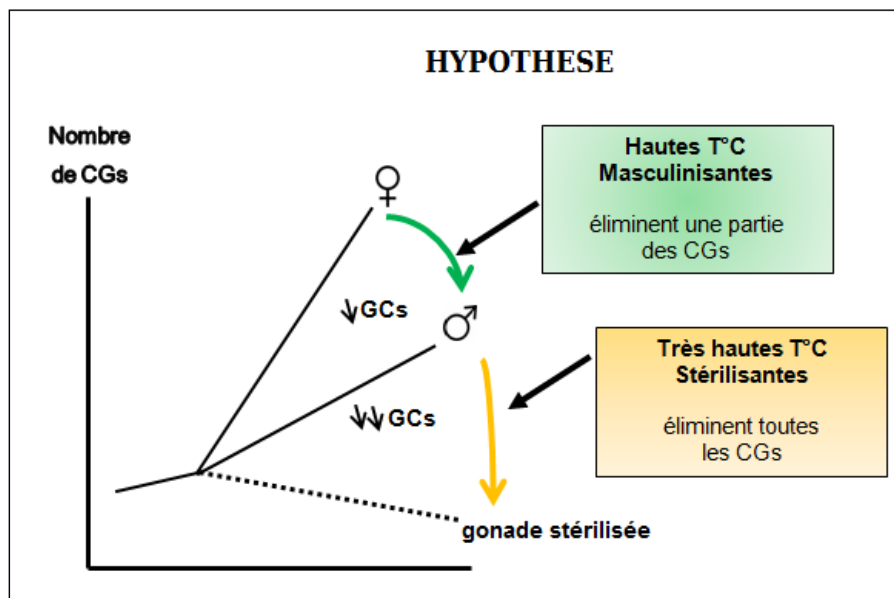


Figure 30. Représentation schématique de notre hypothèse qui serait que les effets masculinisants des fortes températures pourraient être dûs à la baisse du nombre de cellules germinales par apoptose et que les très hautes températures pourraient promouvoir une stérilisation gonadique avec la mort de toutes les cellules germinales.

2.4. Article n°1 : Mécanismes cellulaires et moléculaires de la stérilité induite par les hautes températures chez les femelles tilapias du Nil

Cellular and molecular mechanisms of sterility induced by high temperature in female Nile tilapias

(article soumis dans le journal Molecular of Reproduction and Development)

Marie-Raphaëlle Almin¹, Sandra Marroquín Martínez¹, Helena D'Cotta¹, Marc Canonne¹, Marina Govoroun² and Jean-François Baroiller*¹

¹UMR-ISEM (Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier), CIRAD, TA B-116/A, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5, France

²UMR 6175–Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA- CNRS-Université F. Rabelais de Tours, Haras Nationaux, 37380 Nouzilly France.

*corresponding author: baroiller@cirad.fr

Marie-Raphaëlle Almin: marie-raphaelle.almin@cirad.fr,

Sandra Marroquín Martínez : sanmarromar@gmail.com,

Helena D'Cotta: dcotta@cirad.fr,

Marc Canonne: marc.canonne@cirad.fr,

Marina Govoroun: Marina.Govoroun@tours.inra.fr

No conflict of interest exists between the authors

ABSTRACT

Heat-stress is known to affect fertility in vertebrates including fish. To sterilise Nile tilapia, we applied elevated temperatures of 37°C for 30 or 60 days to treat fry and juveniles of all-female XX progenies. Treatments of 60 days caused the maximum and permanent sterility particularly in fry with the gonads appearing macroscopically as string-like structures (50 to 85% individuals) or completely translucent (25%). Gonado-somatic index was lower in treated tilapia. Less affected gonads (5 to 10%) share sterile and fertile sections. High temperatures affected ovarian morphology becoming disorganised and in some cases acquired a male-like lobule conformation, with both germ cell and similarly some somatic cell depletion. Cell degeneration occurred through apoptosis as assessed by TUNEL analysis. Cell proliferation analysed using the PCNA marker was also reduced in gonads of heat-treated tilapia. Using VASA the germ cell marker, we counted the number of germ cells and these were decreased even in the partially sterile fish. Decrease in *vasa* gene expression was correlated with lower protein detection. Likewise, both aromatase *cyp19a1a* and *amh* gene expressions were reduced in temperature treated fish. Variability in the proportion of sterile tilapias induced by high temperatures may be due to the thermosensitivity differences that exist amongst tilapia strains, families and even individuals. The 37°C-induced sterility does not appear to pass systematically through a masculinisation process. Our study shows that high-temperature treatments cause germ cell loss resulting in partially or complete sterility.

Keywords: germ-cell degeneration, *vasa*, *pcna*, expressions

INTRODUCTION

Sexual maturation in many economically important fish species entails decreased growth rates, higher mortalities associated to lower resistance to pathogens and deterioration in flesh quality (Salem *et al.*, 2006 ; Baroiller *et al.*, 2009 ; Fraser *et al.*, 2012). Fish producers overcome these negative effects by only keeping the sex which grows faster or matures later. XX males siring all-female populations are produced through masculinisation in salmonids and this can be coupled with triploidisation treatments to sterilise the fish (Benfey, 2015). To obtain all-male populations in tilapia, producers mainly use hormonal sex reversal (Beardmore *et al.*, 2001 ; Devlin and Nagahama, 2002). However, the use of hormones for direct male monosex production is controversial with concerns for the environment (water and biodiversity) and the safety or the worker's health. Triploidisation on the other hand can result in low survival rates in some fish species (Piferrer *et al.*, 2009) and is not totally reliable, since triploid female loaches for instance (Oshima *et al.*, 2005) can generate haploid eggs that can be fertilised (Morishima *et al.*, 2008). Moreover, this technique requires the egg stripping and their fertilisation which is complicated in non-synchronous breeders such as in tilapia. There are several other possible sterilising procedures such as transgenesis or the delivery of compounds but these are not applied commercially (Wong and Zohar, 2015). Production of sterile fish would be nevertheless a good alternative to overcome the drawbacks of reproduction but also as a means of confinement of farmed fish. Sterile farmed-fish would avoid gene flow on wild fish from domesticated or genetically improved escapees (Thorstad *et al.*, 2008 ; Glover *et al.*, 2013).

The presence of germ cells is necessary for ovary formation and differentiation in some fish species (Nishimura and Tanaka, 2014). Mammals in contrast, do not show impaired gonad formation or sex-differentiation, but germ cells contribute to proper folliculogenesis or spermatogenesis (Couse *et al.*, 1999 ; Youngren *et al.*, 2005 ; Guignou and Magre, 2006). The ablation of germ cells in zebrafish embryos caused development into sterile adult males that had a degenerated gonad (Slanchev *et al.*, 2005). Likewise in medaka irrespectively of their genetic sex (XY or XX), induced germ-cell depletion caused masculinisation of secondary sex characteristics with sterile gonads synthesising androgens and losing the female granulosa and the estrogen-producing cells (Kurokawa *et al.*, 2007). In both these fish species the somatic cells appear to be pre-disposed to develop into male cells, but this is not the case for other species such as the goldfish and loach (Goto *et al.*, 2012 ; Nishimura and Tanaka, 2014).

Heat-stress can induce sterility by disrupting spermatogenesis in mammals (Yin *et al.*, 1997 ; Rockett *et al.*, 2001 ; Bedford, 2015) and in poultry (Karaca *et al.*, 2002). Higher scrotal temperatures in humans due for instance to the use of laptop computers (Sheynkin *et al.*, 2005) and possibly tight-clothing are factors considered to be responsible for distorted sperm nuclei with abnormal and few spermatozoa (Bedford, 2015). Increased temperature *in vitro* has been shown to also reduce fertility in bovine follicles (Bridges *et al.*, 2005). In several fish species, high temperature treatments have also been shown to cause germ cell degeneration. In the pejerrey a species with temperature sex determination, high temperatures alone (Strüsmann *et al.*, 1998) or coupled to busulfan (Madjhi *et al.*, 2008) induced germ cell loss by apoptosis without affecting the sex-ratio of the sterile gonad (Ito *et al.*, 2008a, b). Germ cell degeneration with high temperatures also occurred in fugu (Lee *et al.*, 2009) and in the zebrafish (Uchida *et al.*, 2004), two fish species where sex is not governed by temperature. More worrying is the possible effect of global warming on the fertility of wild fish populations. Years of elevated temperatures affected the fertility of wild Patagonian populations with gonads having germ cell depletions that resemble those found in laboratory fish treated to elevated temperatures (Ito *et al.*, 2008).

Tilapias are used as fish models but are also important for their world production. Because they mature early, females can reproduce monthly under favourable temperatures and have therefore a lower growth rate than males, tilapia farmers treat fry with androgens to obtain all-male offspring (Beardmore *et al.*, 2001). Although the Nile tilapia has a genetic XX/XY system, high temperatures of 34°C-36°C can induce XX fry to become males (Baroiller *et al.*, 1995 ; Baroiller *et al.*, 2009). In some rare progenies temperature has no masculinising effect or was shown to induce up to 18% partially or totally sterile fish (Baroiller and Clota, 1998). These differences may stem from variable sensitivity towards temperature-masculinisation amongst families or individuals within a strain and between strains or populations (Baroiller and D'Cotta, 2001 ; Bezault *et al.*, 2007 ; Baroiller *et al.*, 2009). Tilapias can be a good model to study further the use of high temperatures to sterilise aquaculture fish species, an alternative to triploidisation. They have an additional advantage that sex-specific effects of sterilising temperatures can be analysed because genetic all-female and all-male progenies can be produced using XX and YY male breeders, respectively (Devlin and Nagahama, 2002 ; Baroiller *et al.*, 2009).

Very recently Pandit *et al.* (2015) showed that temperatures of 37°C applied for 45 or 60 days caused germ cell depletion in female gonads of Nile tilapia belonging to the Chitralada

strain present in Japan. The temperature treatments could sterilise all the individuals when fry or early juveniles were treated and the effect appeared to be permanent. No change in sex-ratio was observed. The authors measured serum levels of testosterone, 11-ketotestosterone and 17 β -estradiol which were all lower in temperature-induced sterile fish. However, the process through which high temperature sterilised these females remains unknown. Furthermore, it is not known whether temperature sterilising effects also exists in other Nile tilapia strains.

In the present study the effects of 37°C temperature to induce sterilisation or a masculinisation of Nile tilapia gonads was studied in females belonging to two different strains to see whether there is a germ cell depletion in both strains and if it is caused by apoptosis associated or not to reduced cell proliferation. The number of germ cells was evaluated using the germ cell-specific VASA antibody and at the molecular level, the *Vasa* transcript. In addition we analysed the high temperature effect on somatic cells at the molecular level by monitoring the transcripts of the granulosa-marker aromatase *cyp19a1a* and the Sertoli-marker *amh*.

RESULTS

Impact of 37°C temperatures on fish survival and gonad morphology

Fish reared at 37°C suffered high mortalities for both fry and juvenile progenies whatever the treatment period (Table 5). The survival rates for the Fry-37°C groups were between 9 and 31%, although in two progenies a high mortality was also encountered for the control groups suggesting egg quality or rearing problems. For the Juv-37°C survival rates were of 41% here again lower than that of the controls (98%). The gradual increase in temperature did not improve the survival. Mortalities that started around 15 days of treatment could be attributed to a decrease in feeding efficiencies (Pandit *et al.*, 2015) rather than lethal effects of the 37°C temperature (see discussion).

Due to the small size of the gonad in the 37°C treated fish, we had to wait for an extended time-lapse of four months after the treatment in fry and for two months in juveniles to be able to observe and analyse the temperature effects in our fish. Gonads of the Fry-27°C and the Juv-27°C groups presented different stages of oogenesis with individuals assigned in previtellogenesis 1 (Fig. 31A) when the gonads contained some small oocytes, a previtellogenesis 2 stage (Fig. 31B) characterized by having a large number of small oocytes

and a vitellogenic stage (Fig. 31C) with gonads containing large oocytes. The number of individuals having ovaries at similar stages was significantly reduced in all the 37°C groups and was only of 5% when treated for 60 days. When affected by the high temperature, the gonads were considerably smaller, nearly inexistent particularly for fry not permitting the GSI analysis. Different types of sterility were observed in the 37°C treated fish with a higher proportion of gonads affected when the fry were treated for 60 days compared to 30 days (table 5). For the 60 day-treated fish, a large percentage (50 to 85%) of the affected-gonads, was extremely small and thin with a string-like appearance (STL) (Fig. 31D) while other gonads (25%) were translucent (TSL) (Fig. 31E & F). Five to ten percent of the gonads presented a partial sterilisation (PSG) which varied in appearance and in the amount of gonadal regions affected (Fig. 31G). The mean average width of the gonads in the fry P3 progeny was of $1346 \pm 77.3 \mu\text{m}$ for the Fry-27°C whereas for the Fry-37°C, the mean width was of $214 \pm 31.4 \mu\text{m}$ in the STL gonads and of $198 \pm 29.8 \mu\text{m}$ for the TSL gonads. In a PSG gonad where two distinct sections were observed, the average width of the section resembling a testis was of $379 \mu\text{m}$ while the other section corresponding to an ovary was $1456 \mu\text{m}$.

Similar gonad morphologies were observed in the Juv-37°C group (Table 5). In this group all the gonads had a significantly lower GSI ranging from 0.01 ± 0.003 for the STL to 0.45 for the TSL including the ovaries (1.32 ± 0.48) compared to the Juv-27°C fish (3.44 ± 0.41). The measured gonad width decreased about three-fold in Juv-37°C with $707 \pm 110.6 \mu\text{m}$ compared to $2158 \pm 68.4 \mu\text{m}$ measured in Juv-27°C fish.

We produced all-female XX progenies for this study, but found males amongst the Fry-27°C females, with 7% males in the Manzala P2 progeny and 35% males in the Bouake P1 progeny (Table 5). The male proportions increased in four out of five progenies analysed in both the Fry-37°C and Juv-37°C groups and was significant ($p < 0.0001$) in two progenies (Table 5).

Histological analysis of the gonads

Light microscopy revealed that the gonads of the control 27°C fish in fry progenies had normal ovaries with an ovarian cavity, and after two months presented oocytes at various stages of development notably numerous oogonia and no mature follicles. Later at 4MAT these progenies presented nearly mature ovaries composed of primary oocytes (Oo), primary perinuclear oocytes (PN1), secondary perinuclear oocytes (PN2), previtellogenic

Table 1 : Effects on XX male tilapia of 37°C treatments applied to fry and juveniles during 30 or 60 days

Progeny	Stain	Stage	Fish age dpf	Treatment	Treatment time (d)	Sexing time (MAT)	Gonad Phenotype	GP %	Survival rate (%)
P1	Bouake	Fry	10	27°C	30	6	Ovaries	65	97
							Testes	35	
				37°C	30	6	Ovaires	41	
							Testes	23	
							PSG	18	
							SG - STL	7	
P2	Manzala	Fry	10	27°C	30	6	Ovaires	93	98
							Testes	7	
				37°C	30	6	Ovaires	64	
							Testes	9	
							PSG	27	
P3	Manzala	Fry	10	27°C	60	4	Ovaries	100	50
				37°C	60	4	Ovaries - PSG	10	
							Testes ***	15	
							SG - STL	50	
							SG - TSL	25	
P4	Manzala	Fry	10	27°C	60	4 & 14	Ovaries	100	62
				37°C	60	4 & 14	Ovaries	5	
							Testes	5	
							PSG	5	
							SG - STL	85	
P5	Manzala	Juveniles	110	27°C	60	2	Ovaires	100	93
				37°C	60	2	Ovaires	30	
							Testes ***	11	
							PSG	30	
							SG - STL	25	
							SG - TSL	4	41***

Dpf: days post-fertilization, MAT: months after the end of the treatment, GP: gonad phenotype, PSG: partially sterile gonads, SG-STL: string-like sterile gonads, SG-TSL: translucent sterile gonads, *** : P<0.0001

Tableau 5. Sexages des descendances monosexes femelles (XX).

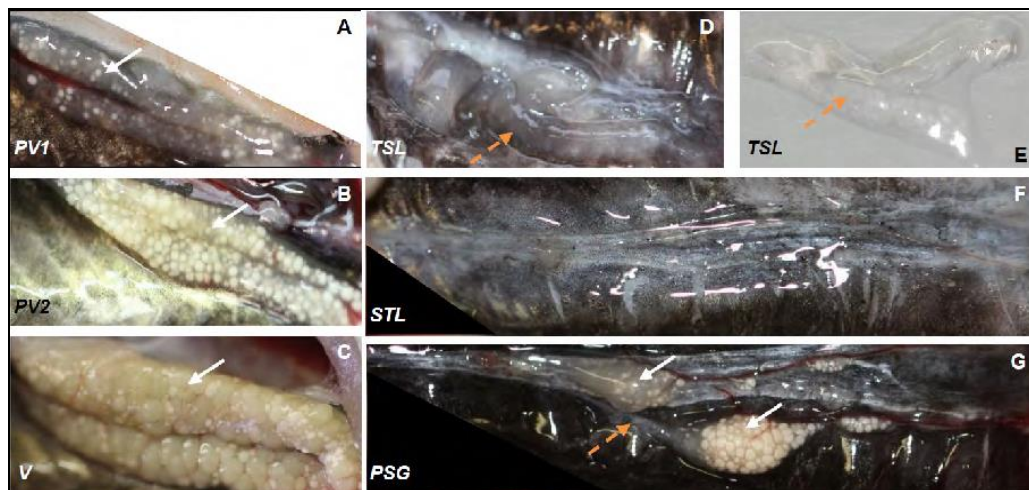


Figure 31. Gonad morphologies of Nile tilapia XX females at the time of sexing (4 months after the end of the 37°C treatment of fry), of the 27°C controls showing different stages of ovogenesis: A previtellogenic 1 (PV1), B previtellogenic 2 (PV2) and C vitellogenic oocytes. Types of sterilised gonads observed in the 37°C-treated fish: D string-like (STL) E-F translucent (TSL) and G partially sterile (PSG) gonads. A white arrow shows oocytes and dotted orange arrows show translucent areas.

oocytes (PVF) and vitellogenic oocytes (VF), with follicles where the granulosa (Gr) and theca cells (Th) could be clearly distinguished (Fig. 32A & B). In contrast, in fry treated to 37°C particularly those treated for 60 days, both the string-like gonads and the translucent gonads were abnormal with a disorganised structure and appeared depleted of germ cells lacking even early differentiating oogonia (Fig. 32C-G). Within the STL and TSL sterile gonads we found some histological similarities. In some gonads the ovarian cavity could be observed (Fig. 32C & D) with the ovigerous lamellae composed of few cell layers some corresponding to steroid producing cells. In other gonads the structure was even more disrupted with mostly empty lumen filled or not with fluidic material with a thin lamellae containing a stroma layer occupied mostly by supporting cells that resembled steroid producing cells, as well as vascular cells (Fig. 32E-32G). Other disrupted gonads appeared to have lobule-like structures resembling the testes with efferent-like ducts and Leydig-like cells (Fig. 32E-F & Fig. 33A-B). Curiously in one Fry-37°C fish, the shrunken gonad (Fig. 32E) classified as STL appeared deficient in germ cells but yet what appeared to be spermatids were observed in the lumen of efferent-like ducts suggesting that this individual was or had become a male and that the 37°C treatment did not cause total sterility. Some partially sterile gonads (PSG) had two very distinct gonad portions, one resembling an ovary (Fig. 33C) which could be more or less degenerated and another portion resembling a testis structure with cysts apparently lacking germ cells, surrounded by numerous Leydig-like cells (Fig. 33A-B).

The Juv-27°C fish had normal mature ovaries (Fig. 33D) whereas all the Juv-37°C individuals had abnormal ovaries with different degrees of cellular disorganization. They showed partial or nearly total absence of oocytes, with the presence of atretic follicles and in some cases apparently intact follicular cells as well as material resembling phagocytic residues (Fig. 33E).

Depletion of vasa-stained and PCNA-stained cells in the 37°C treated fish

Absence of staining with the vasa antibody in the Fry-37°C gonads further confirmed the depletion of germ cells found in both the STL and TSL gonads, which we therefore considered sterile (Fig. 34B-D). In contrast in the Fry-27°C gonads, the antibody clearly marked the cytoplasm and the zona pellucida of developing oogonia and oocytes, becoming diffuse and subsequently becoming invisible in maturing follicles (Fig. 34A). Quantification of the number of vasa-labelled cells confirmed the severe depletion of the germ cells in the sterile individuals in both the STL and TSL gonads. However, values suggested the possible

presence of some rare scattered germ cells: for instance for the P3 progeny 4.6 ± 2.5 ($p < 0.0001$) percent vasa cells in the slides analysed, were observed in the STL gonads and 8.1 ± 1.5 ($p < 0.0001$) for the TSL gonads, compared to the 27°C reared gonads (86.83) (Fig. 34G).

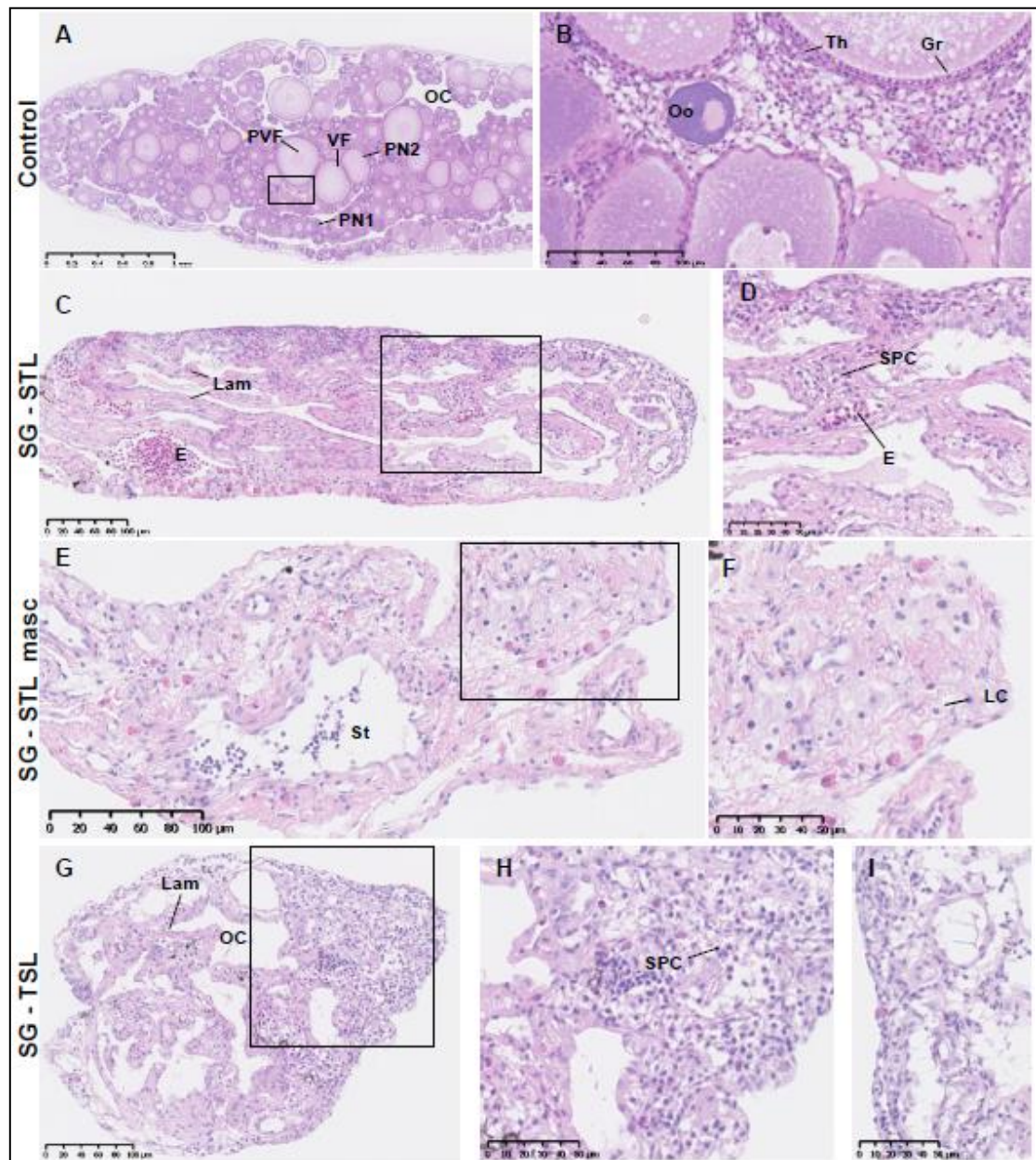


Figure 32. Histological sections of female gonads at the time of sexing (four months after the end of the treatment) of 27°C controls and 37°C-treated fry for 60 days stained with Hematoxylin/Eosin (HE). A: a 27°C control ovary showing different stages of oocytes: primary oocytes (Oo), primary perinuclear oocytes (PN1), secondary perinuclear oocytes (PN2), previtellogenic oocytes (PVF) and vitellogenic oocytes (V). B: Amplification of (A) box, showing the somatic theca cells (Th) and granulosa cells (Gr). C: sterile string-like gonad (SG-STL) devoid of oocytes, with the ovigerous lamellae (Lam) composed of some steroid producing cells (SPC) and erythrocytes (E). D: Amplification of (C). E: sterile string-like gonad exhibiting a masculinisation with testicular cord-like organization resembling efferent-like ducts and presence of a few spermatids in the lumen (LC). F: Amplification of (E) showing Leydig-like cells. G: sterile translucent gonad (SG-TSL) with absence of germ cells where the ovarian cavity, the ovarian lamellae and steroid producing cells are observed. H: Amplification of (G). I: Transversal section of SG-TSL.

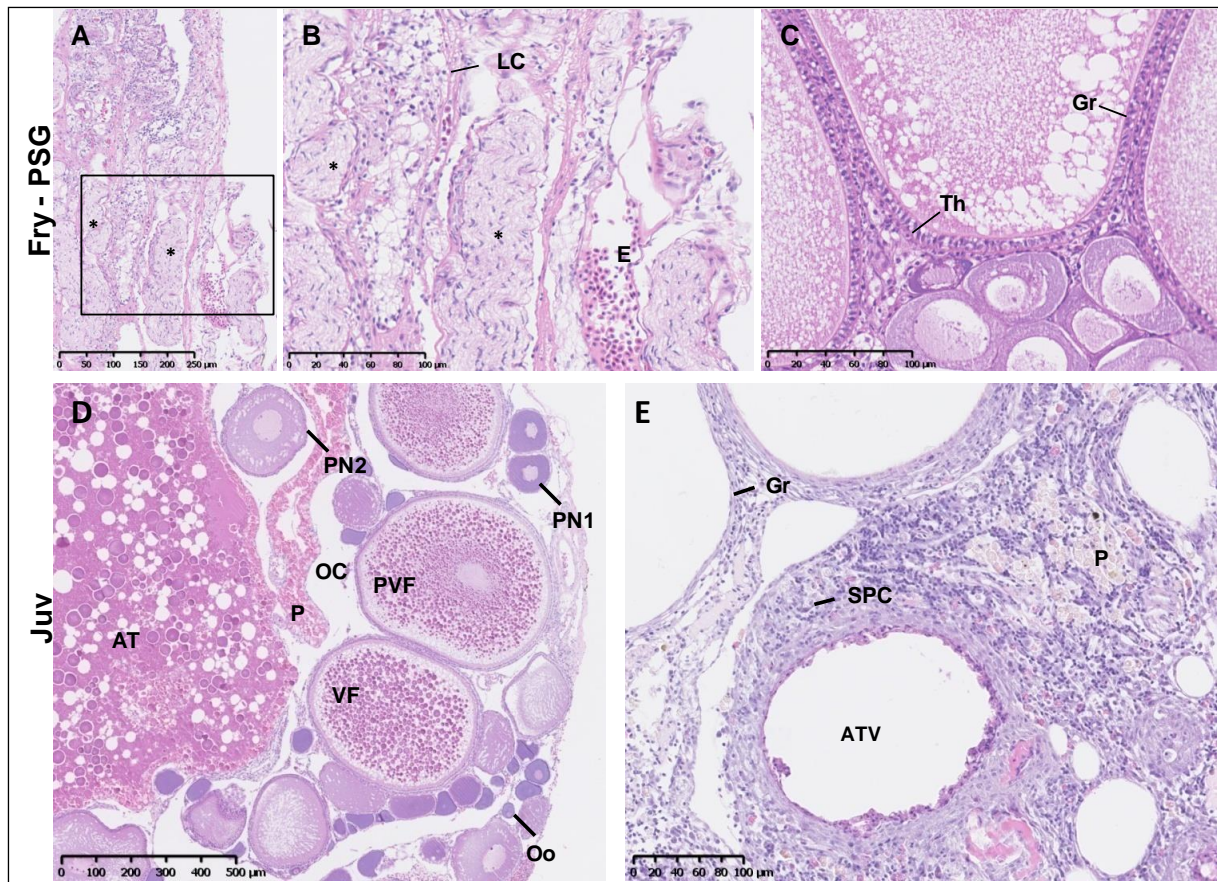


Figure 33. A-C Histological sections stained with Hematoxylin/Eosin (HE) of partially sterile gonads (PSG) from the 37°C fry-treated group. A: Sterile region of a PSG fry-37°C treated female absent of germ cells showing a testes-like configuration with disorganised cysts (asterisk) and Leydig-like cells (LC). B: Amplification of A. C: Ovarian section of a PSG with oocytes at different stages. D-E Histological gonadal sections of juveniles reared at 27°C or treated to 37°C at the sexing time (2 months after the end of the treatment) D: Normal ovary of a 27°C juvenile control with different stages of oocytes: primary oocytes (Oo), primary perinuclear (PN1), secondary perinuclear (PN2), previtellogenic (PVF), vitellogenic (V) and atretic (AT) oocytes. E: A 37°C-treated ovary showing cellular disorganisation with absence of oocytes but presence of follicular cells (FC), steroid producing cells (SPC), atretic follicles (ATV) and phagocytic residuals (P) are observed.

The number of maturing and mature follicles was increased in the gonads of Juv-27°C, with the vasa antibody labelling only developing oocytes but not mature follicles (Fig. 34E). In the Juv-37°C less vasa-stained cells were observed with some labelling of presumably primary perinuclear oocytes (PN1) (Fig. 34F). Quantification of vasa-stained cells also decreased but only slightly in the Juv-37°C (33.4 ± 2.8 ; $p > 0.5$) compared to the controls (37.9 ± 7).

We then analysed whether a cell proliferation was occurring in the control Fry-27°C gonads using the PCNA antibody. A marked coloration was observed in the nuclei of primary oocytes, oocytes at perinuclear stages as well as vitellogenic oocytes (Fig. 35A). Staining was also visible in supporting cells. In the Fry-37°C gonads, PCNA labelling was restricted but

found in large quantities to supporting cells which could be steroid producing cells (Fig. 35B-C). Analysis of the PCNA labelled area evaluated in several fry treated individuals showed rather similar levels for the sterile TSL (0.50 ± 0.9) and STL (0.44 ± 0.3) gonads to the controls Fry-27°C (0.99 ± 0.2) (Fig. 35F). Comparable amounts of PCNA-labelling were seen in the sterile portions of the PSGs (Fig. 35D), whereas more stained cells were detected in the regions resembling ovaries (Fig. 35E), resulting in relatively high mean levels of PCNA-cells (2.84 ± 0.6 , $p < 0.05$) in the PSG (Fig. 35F).

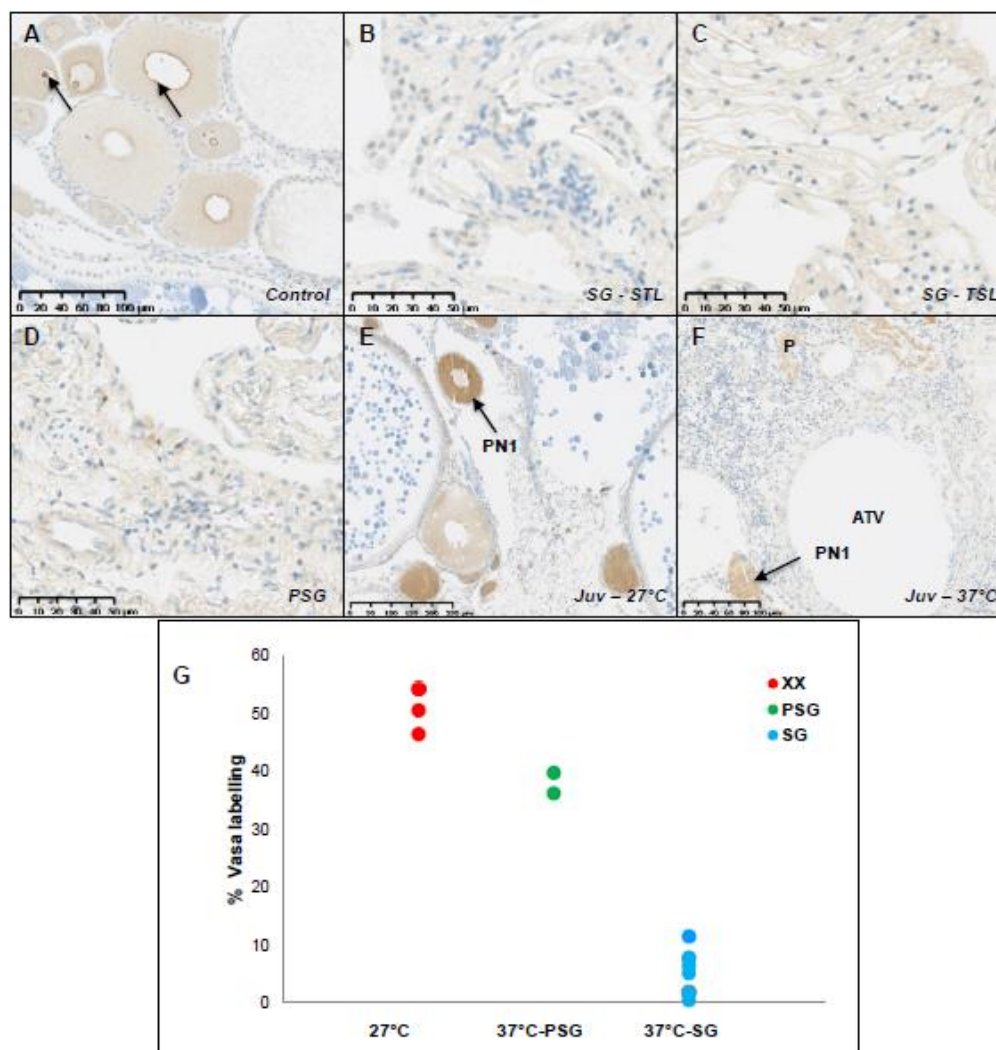


Figure 34. Vasa immunochemistry of the female gonads of fry (A-D) and juvenile (E,F) tilapia exposed to either 27°C or 37°C for 60 days, at the sexing-time A: Section of a 27°C control ovary exhibiting Vasa staining of germ cells, in the "zona pellucida" (blue arrow) and cytoplasm of oocytes, while no Vasa staining, indicating absence of germ cells, was observed in B sterile string-like gonad (SG-STL), in C sterile translucent gonad (SG-TSL) and in D the sterile portion of a partially sterile gonad (PSG). E: Section of a 27°C juvenile ovary showing Vasa reaction on a primary perinuclear oocyte (PN1). F: Few germ cells are observed in a section of a 37°C juvenile-treated ovary. G: Graph showing the % vasa labelled cells in 27°C reared fry (red) from progeny P3 at the sexing-time, and values for the 37°C fry-treated females showing intermediate values for the PSG (green), and very low values found in the SG-STL (blue) and SG-TSL (yellow).

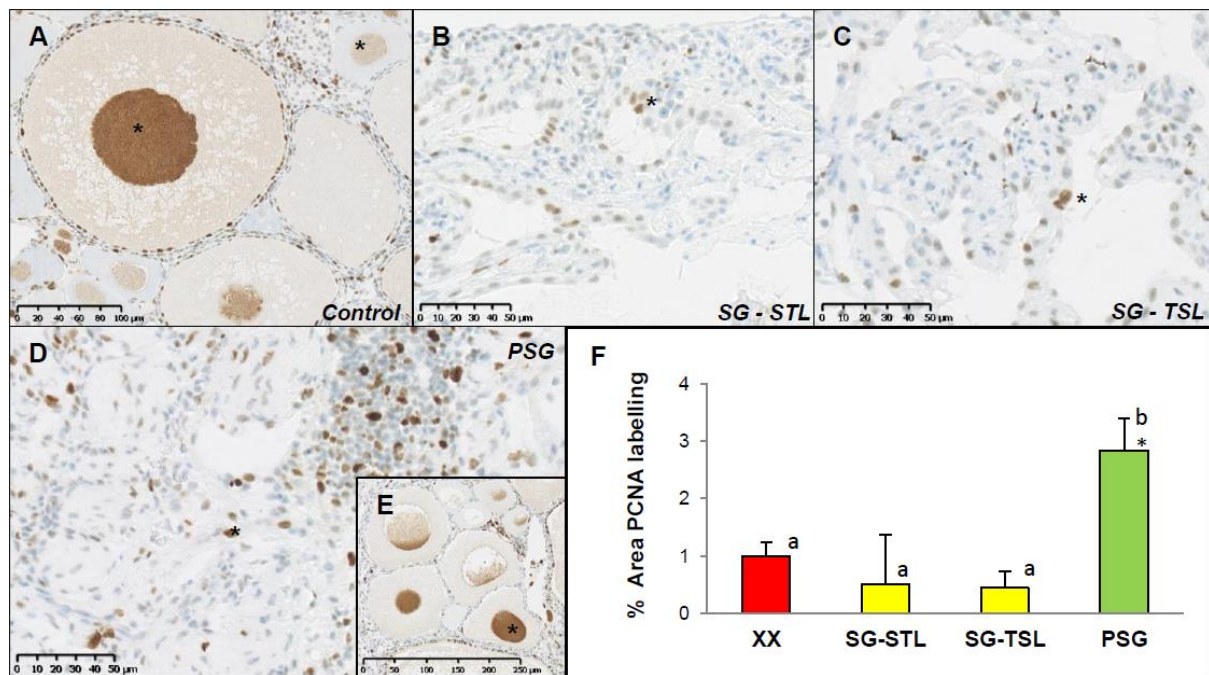


Figure 35. PCNA immunocytochemistry of female gonads of fry exposed to either 27°C or 37°C for 60 days, at the sexing-time **A**: 27°C control ovary with PCNA staining (asterisk) in nucleus of most oocytes at different stages and in some follicular cells. **B-D**: Low PCNA staining observed in the gonads of 37°C-treated fry, indicating decreased proliferation. **B**: sterile string-like (SG-STL), **C**: translucent (SG-TSL) gonads show few somatic cells PCNA-positive also seen in the sterile portion of a partially sterile gonad (PSG) gonads **D**, while the fertile region **E** showed abundant proliferation. **F**: Graph showing the % surface area PCNA-labelled, for all the gonad categories. Each value represents the mean ± SEM. The differences are significant with *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.005$, Fisher's exact test.

Germ cells undergo apoptosis in the 37°C treated gonads

Cells undergoing apoptosis were analysed using TUNEL, which detects the apoptotic nuclei that are stained in brown after the Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (rTdT) incorporates biotinylated nucleotides. Apoptotic cells were observed in both the sterile STL (Fig. 36B) and TSL gonads (Fig. 36D) and likewise, in the sterile sections of the PSG (Fig. 36C). In contrast TUNEL-stained cells were reduced in the Fry-27°C gonads (Fig. 36A). Quantification of the proportion of TUNEL labelled area for the Fry-27°C gave an average of 0.43 ± 0.1 whereas significantly higher labelled surfaces were observed for both the sterile STL gonads (1.96 ± 1.2 , $p = 0.0024$) and the TSL gonads (1.93 ± 0.6 , $p = 0.0037$) but the PSG had similar values with the controls (0.27 ± 0.07 , $p = 0.99$) (Fig. 36H).

In the Juv-37°C gonads apoptotic cells were also visualised (Fig. 36F) while few stained cells were detected in the Juv-27°C (Fig. not shown). The proportion of TUNEL surface analysed in two juveniles showed much higher levels for the Juv-37°C (3.20) compared to the control at 27°C (0.65).

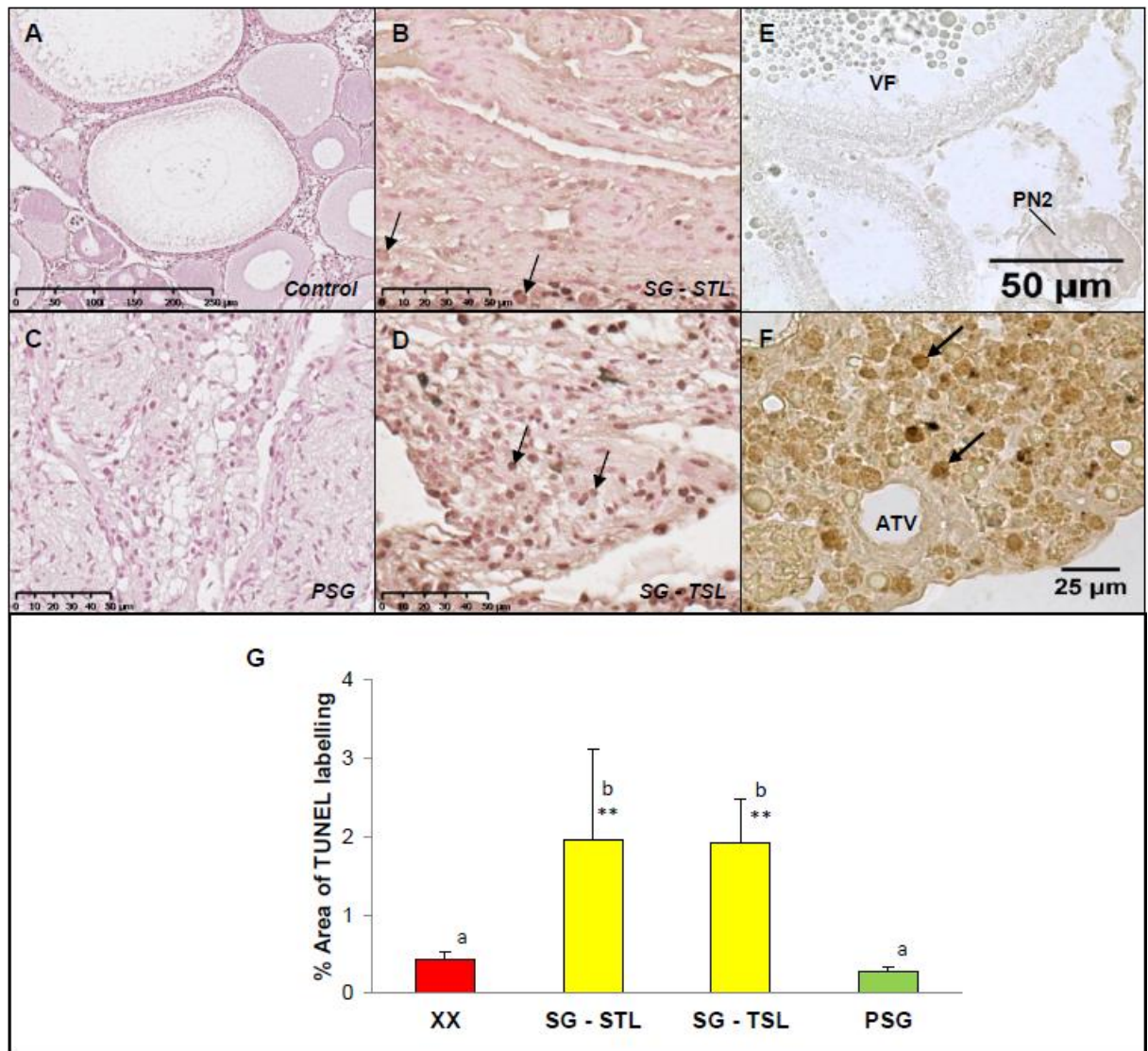


Figure 36. Cell apoptosis of germ cells in the gonads of 37°C-treated fry (A-D) and juveniles (E-F) visualized by the TUNEL assay. A: Few or no TUNEL-positive cells are observed in 27°C fry ovaries with increased in TUNEL-positive cells (black arrow) in sterile string-like (SG-STL) B, and translucent (SG-TSL) C gonads, with a few TUNEL-positive cells in D partially sterile gonad (PSG). E: Control juvenile ovary with few or not apoptotic cells. F: 37°C-treated juvenile gonad with many apoptotic cells. G: Graph showing the quantification of TUNEL labelling (% labelled area) in fry fish reared at normal 27°C and treated at 37°C. Each value represent the mean \pm SEM. *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.005$, Fisher's exact test.

Expression patterns of cell-marker genes

Vasa gene expressions further confirmed degeneration of germ cells in the 37°C treated groups. Relative expression analysed in two different progenies showed lower *vasa* levels in the Fry-37°C already at 15 days of treatment with averages of 0.02-0.15 ($p > 0.5$) compared to the 27°C controls (0.11-4.65), but become more pronounced after 30 days with values of 0.03-0.151 ($p > 0.5$) for the Fry-37°C compared to Fry-27°C (2.74-22.61), (Fig. 37A & B).

Juv-37°C had significantly lower *vasa* expressions at the end of 60 days of treatment (1.49 ± 0.8 , $p < 0.5$) compared to the Juv-27°C (16.94 ± 3.5) but levels increased after this in the Juv-37°C becoming non-significant (3.86 ± 1.4 , $p > 0.5$) at 2 MAT while levels decreased in controls (11.36 ± 2.1) (Fig. 38A). The gonad aromatase *cyp19a1a* expressions for the Juv-37°C were lower (8.77 ± 3.7 , $p < 0.001$) than the Juv-27°C (45.23 ± 13.7) at both 60 DT and 2MT (1.86 ± 0.9 , $p < 0.001$) (Fig. 38B). *Amh* expression was detected in the gonads of Juv-27°C (1.44 ± 0.4) and decreased significantly in the Juv-37°C (0.21 ± 0.04 , $p < 0.5$) at 60 DT but not at 2MT (0.17 ± 0.04 , $p > 0.5$) (Fig. 38C).

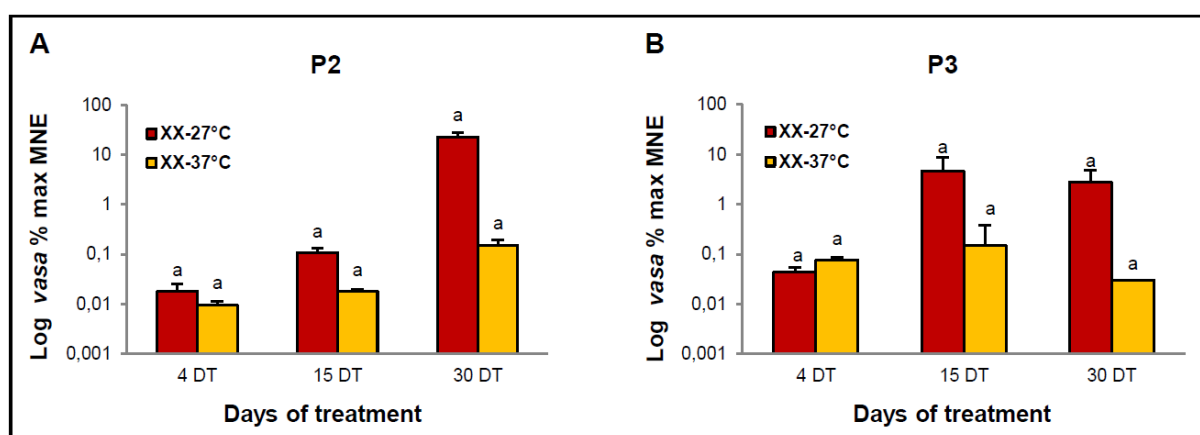


Figure 37. Transcript levels of the germ cell marker gene *vasa* analysed in the trunks of 27°C controls and 37°C treated fry at 4 and 15 days, and in gonads at 30 days of treatment. Each value represent the mean \pm SEM. P2: progeny 2 (n=6); P3: progeny 3 (n= 6). $P > 0.05$, Mann Whitney test.

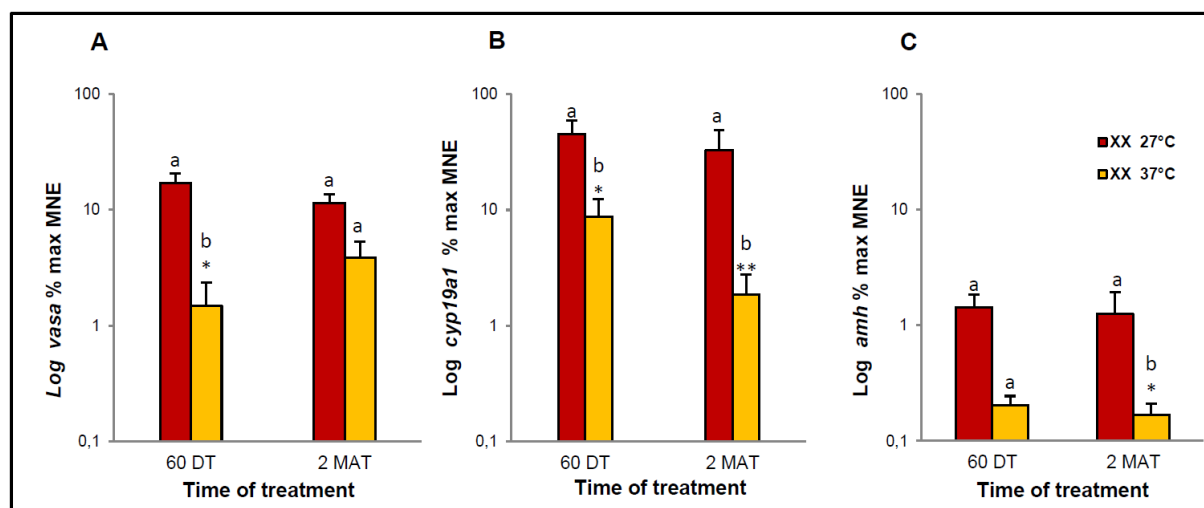


Figure 38. Transcript levels of (A) the germ cell-marker gene *vasa*(B)the granulosa-marker gene *cyp19a1a* and (C)the granulosa and Sertoli-marker gene *amh* analysed in the gonads of 27°C controls and 37°C treated juveniles after 60 days of treatment (60 DT) and at 2 months after the end of treatment (2 MAT). Each value represent the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, Mann Whitney test.

DISCUSSION

In this study we used high temperatures of 37°C to deplete germ cells in female Nile tilapias, seeing whether there are changes in sex-ratios and analysing the mechanisms of depletion, aided by the use of specific cell markers (antibody or genes). Our study shows that 37°C treatments affect the gonads of female Nile tilapia causing complete or partial depletion of germ cells and consequently sterilisation of the gonads. The 37°C treatments of fry initiated at 10 days post-fertilisation (dpf) were more efficient when applied for 60 days inducing complete loss of germ cells in nearly 85% of the fish. The induced sterility was permanent with no recolonization of the gonad four months after the temperature treatment and we verified that sterile individuals prevailed at 14 months of age. Exposure to 37°C for 30 days either had no effect or there was a partial loss of germ cells. At 10 dpf the gonads in Nile tilapia are still undifferentiated and have reduced number of germ cells, with 38 to 58 primordial germ cells (PGC) (D'Cotta *et al.*, 2001). During this stage the gonads are very sensitive to external cues such as temperature and hormones which can induce sex-reversal in both sexual genotypes (Devlin and Nagahama, 2001 ; Baroiller *et al.*, 2009).

The gonads around 14 dpf start displaying sexually-dimorphic gene expressions and at 17-18 dpf, the first morphological changes are seen in the differentiating ovary with the proliferation of the PGCs, while the differentiating testis stays quiescent until their germ cells proliferate at ~35 dpf (D'Cotta *et al.*, 2001 ; Ijiri *et al.*, 2008 ; Kobayashi and Nagahama, 2009).

As we anticipated induction of germ-cell depletion was more efficient in fry at these stages than in juveniles which comparatively showed only about 30% individuals with complete sterility. In medaka two types of germ cells have been demonstrated, with type I being stem-like single cells that are mitotic (Gs) while type II are germ cells in cysts (Gcys), gametogenesis-committed which enter meiosis synchronously (Saito *et al.*, 2007 ; Nishimura and Tanaka, 2014). In tilapia, no proper designation of germ-cell types has been done. We presume that germ cell depletion that occurred in fry was easier due to the low number of PGCs but also to the fact that they might still be largely undifferentiated Gs-like and “thermo-sensitive”. In contrast, the oogonia in juveniles might be mostly differentiated or predisposed cells Gcys-like. Female-to-male sex reversal in juveniles has been shown surprisingly to be still possible in both tilapia and medaka by depletion of estrogen levels using aromatase inhibitors, but this was only possible in tilapia after a six-month inhibition (Paul-Prasanth *et*

al., 2013 ; Sun *et al.*, 2013). In our case the two months treatment at 37°C of juveniles apparently was not sufficient for complete germ-cell depletion.

While writing this article, two studies were published by Nakamura and co-authors who also used 37°C treatments to sterilise Nile tilapia females (Pandit *et al.*, 2015) and Mozambique tilapia males (Nakamura *et al.*, 2015). They showed that at least 45-day treatments of 37°C were necessary to induce 100% sterility in female Nile tilapia fry but similarly to our study, longer exposures were necessary for juveniles with differentiated ovaries, with 2 months treatment for the 164 dpf fish not being enough to completely eliminate germ cells. Remarkably, 35°C treatments of fry were not sufficiently elevated to completely deplete the germ cells since they recolonised the gonad (Pandit *et al.*, 2015). In contrast 37°C was efficient in totally depleting the germ cells permanently which suggests that the germ cell of a Gs stem-type could only be destroyed at the higher temperature.

Fry are still fragile at the sex-differentiating stage and the extended days of high temperature treatments in our study caused extremely high mortalities. In general, we found that fish ate badly. We have previously reported stagnant growth sometimes associated to increased mortalities in progenies or individuals not sensitive to the 36°C temperature-induced masculinisation (Baroiller *et al.*, 2009) but never to this extent. Elevated temperatures accelerate the fish metabolism and additional supply of food and oxygen are required. Pandit *et al.* (2015) in Nile tilapia and Nakamura *et al.* (2015) in the Mozambique tilapia males also encountered initially elevated mortalities in fry following a 37°C treatment (Nakamura, pers. comm.). In fact, elevated temperatures of 37°C induced a decrease in food intake/feed consumption and feed efficiency, but also an increase of the rate of gastric evacuation resulting in slow growth and higher mortality rates (Nakamura, pers. comm., Pandit *et al.*, 2015). Nakamura *et al.* compensated for the negative 37°C impacts by supply more energy feed containing high protein proportions and managed to get 81% survival (Pandit *et al.*, 2015). Since this present study, we have managed to improve our mortalities by giving a high-protein ration but further work is needed to increase survivals by improving feed efficiency.

In contrast to Pandit *et al.* (2015), we found amongst the fry a large individual variability in the effect of the 37°C temperature treatment. First, not all the individuals of a progeny were sterile, or had the same degree of germ cell depletion. Second, we also found different sterilised phenotypes when assessing the gonad morphology. Shrinkage of the gonads, appearing either as string-like or translucent, was always associated with sterility. These gonads appeared completely devoid of germ cells. The severe depletion of germ cells in these

gonads was further confirmed by histological observation together with the immunohistochemistry quantification of vasa. Vasa (also called DDX4), is a DEAD-box (Asp-Glu-Ala-Asp) helicase protein restricted to animals' germ-line (Raz, 2000). The vasa antibody we used detected specifically the germ cells in the tilapia ovaries and was confined to the cytoplasm (perinuclear localisation) from oogonia to early differentiating oocytes becoming diffused in developing follicles. These features characterise the vasa protein localisation analysed in various fish species including tilapia (Kobayashi *et al.*, 2002 ; Hartung *et al.*, 2014 ; Pandit *et al.*, 2015). We also analysed the expression levels of the *vasa* gene and these displayed extremely low amounts, here again showing the depletion of the germ cells in many 37°C treated fry. The increase in *vasa* expression detected in juveniles two months after the treatment presumably reflects the regeneration of the gonad. Partial reduction of the gonad with intermediate loss of germ cells was also observed in certain regions of some gonads, considered to be partially sterile individuals. In several of these fish the gonad morphology was so disrupted that it is very likely that the fertility of these individuals was also severely affected. These gonads had intermediate vasa protein amounts.

In this study we wanted to define the underlying cellular activities in the gonad with the 37°C-induced sterilisation. Apoptosis or programmed cell-death is the mechanism involved in the germ-cell degeneration and it was still apparent even at four months after the treatment ended. TUNEL assays detect DNA fragmentation which is a late stage of apoptosis, the programmed cell-death. Apoptosis entails a number of processes, amongst which are the activation of the cells' caspases leading to the self-destruction of the cell with DNA fragmentation and chromatin condensation (Bayir and Kagan, 2008). Heat also caused oocyte apoptosis in the zebrafish resulting in masculinisation (Uchida *et al.*, 2004). Abundant apoptosis of somatic cells was observed in differentiating testes of pejerrey fry treated at high male-producing temperatures, whereas this did not happen in differentiating females (Yamamoto *et al.*, 2013).

We also assessed whether proliferation occurred following the heat-treatments of 37°C in the gonads either by the recolonization of germ cells or the somatic cells. Cellular activity assessed by the immunohistochemistry with the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) antibody was elevated in somatic cells but globally levels were similar to the 27°C females. Similarly strong PCNA signals were found for the somatic cells in adult female tilapias treated with an aromatase-inhibitor, which suffered a transdifferentiation into testes Sertoli and Leydig cells (Sun *et al.*, 2014). Our study showed marked PCNA activity in partially

sterile gonads suggesting proliferation of both germ cells and somatic cells in these gonads. It is possible that a compensatory phenomenon occurred in the fertile regions of these gonads with a hyper-proliferation of germ and/or somatic cells. A compensatory testicular hypertrophy was observed in prepubertal rats after hemicastration together with an increase in androgen secretion (Brown and Chakraborty, 1991).

Aromatase is widely used as a marker of the granulosa cells (Sun *et al.*, 2014) while *amh* is a Sertoli marker and in mammals, it is also a marker of developing follicles (di Clemente *et al.*, 2014). *Amh* is found in lower levels in female fish located mostly in developing follicles and its role in fish might be the inhibition of germ cell proliferation and differentiation, and also steroidogenesis (Pfenning *et al.*, 2015). We observed a marked decrease in the aromatase *cyp19a1a* expression in juveniles that were 37°C treated indicating that the heat-treatment also affected the granulosa cells. *Amh* expression already low in normal ovaries decreased even further upon heat-treatment consistent with lower amounts of follicles found in these fish. Pandit *et al.* (2015) showed that the 37°C induced sterility also affected the steroid-producing cells since both estradiol and 11KT levels were severely decreased. We do not know what the cross-talk is between the germ cells and the gonadal somatic cells. Are the germ cells directing the somatic cell degeneration ? Or is the temperature affecting the somatic cells and these cause germ cell death? Or are the two cell types directly and differently affected by the temperature treatment ?

Interestingly, our work also revealed that the proportion of males increased with the 37°C treatments. However, we cannot exclude a sex-linked mortality induced by the high temperature treatment; a lower survival rate of females could result in an indirect effect on sex-ratio. The macroscopic features and histological observations of a number of 37°C-treated gonads evidenced testis-like morphologies and in some cases, the presence of ovotestis. Despite difficulties in assessing the histology of the gonads due to their disorganisation linked with loss of germ cells, these gonads seemed to have lobular structures with efferent ducts-like and what seemed to be Leydig cells. Moreover, in one supposedly sterile gonad a few spermatids seemed to exist in some of these gonads. Further confirmation of these masculinisations would require a better detection of both the steroid-producing cell types and supporting cells.

We have previously shown that masculinisation can be induced in Nile tilapia fry with treatments of 36°C but this does not occur in all progenies, with some progenies being insensitive to temperature giving a balanced sex-ratio (Baroiller *et al.*, 1996). In fact, we

found a large variability in the degree of thermo-sensitivity in the response to masculinisation between individuals, strains and amongst wild populations (Bezault *et al.*, 2007 ; Baroiller *et al.*, 2009). Because the 36°C temperature we applied for masculinisation and the 37°C used to induce sterility only differs by 1°C, it is not surprising to find a number of gonads that show signs of a masculinisation amongst the partially sterile gonads in the 30 day treatment but features of masculinisation were also evidenced after 60 days of treatment in both partially and sterile gonads. The variability we observed in the 37°C-induced sterility, in the proportion of sterile individuals, in the different phenotypes and in the masculinisation are all in sharp contrast to the results by Pandit *et al.* (2015). A possible explanation of the different effects of a similar treatment might be due to the use of different Nile tilapia strains. Pandit *et al.* (2015) used the Japanese-Chitralada strain whereas we used the Manzala strain (originally from Egypt) and the synthetic Bouake strain developed in Ivory Coast. The Chitralada strain has never been shown to have a bias in their sex-ratio due to temperature. In contrast, both the Manzala and the Bouake strains have been shown to be sensitive to temperature biasing the sex towards males in many progenies (Baroiller and D'Cotta, 2001 ; Baroiller *et al.*, 2009 ; Poonlaphdecha *et al.*, 2013). In fact a highly thermosensitive genetic line giving >92% males following 10 days of a 35°C treatment and a non-sensitive line have been produced for the Manzala strain (Wessels *et al.*, 2007). Despite the demonstrated thermosensitivity of these strains, we have reported in the past, progenies for which 36°C temperatures caused up to 18% sterile individuals instead of a masculinisation (Baroiller and Clota, 1998). It is possible that in these individuals the germ cells in the ovaries were less resistant to high temperatures. This seems to be the case for the Chitralada strain since the 37°C treatments caused complete depletion of the germ cells in the ovaries (Pandit *et al.*, 2015).

Due to the sexual dimorphism in the number of germ cells during tilapia sex-differentiation, we had hypothesised that a critical parameter in the temperature masculinisation in Nile tilapia was the decrease in the number of germ cells of the differentiating ovary (Baroiller *et al.*, 2009). Germ cells have been shown in medaka and zebrafish fish to be essential for the undifferentiated gonad to become an ovary since the depletion of germ cells caused masculinisation (Slanchev *et al.*, 2005 ; Nishima and Tanaka, 2014). In medaka, the loss of the germ cells affected the maintenance of both the somatic granulosa cells and the estrogen-producing cells with the subsequent appearance of male-steroid producing cells coinciding with androgen-11KT synthesis (Kurokawa *et al.*, 2007). Degeneration of oocytes followed by the appearance of testis tissues occurred when tilapia

adults were treated with an aromatase-inhibitor (Paul-Prasanth *et al.*, 2013 ; Sun *et al.*, 2014). Oogonia or stem-type germ cells transformed into spermatogonia originating at the germinal epithelium, with the transdifferentiation of the granulosa cells into Sertoli cells while the Leydig cells were formed from the interstitial cells (Paul-Prasanth *et al.*, 2013 ; Sun *et al.*, 2014).

These studies together with the higher % masculinisation observed with 37°C-germ cell depletion raises the question on whether the 37°C-sterility passes first through a masculinisation of the somatic cells. The results obtained by Pandit *et al.* (2015) do not suggest this hypothesis since they always obtained sterile gonads where the ovarian cavity was observed. Although estradiol levels were severely affected the fish after 5 months resumed estradiol synthesis. We have shown that a critical factor in the temperature-masculinisation of females is the suppression of the *cyp19a1a* expression decreasing the estradiol levels and the % masculinisation correlated with the levels of *cyp19a1a* suppression (D'Cotta *et al.*, 2001 ; Poonlaphdecha *et al.*, 2013). Perhaps decrease but not total suppression of the *cyp19a1a* is also occurring in the 37°C-induced sterility. Total depletion of estradiol levels was the pre-requisite for sex-reversal of ovaries into testes in adults (Paul-Prasanth *et al.*, 2013 ; Sun *et al.*, 2014). The depletion of germ cells in both our study and that of Pandit *et al.* (2015) might not have influenced the fate of the somatic cells of the ovary or perhaps the decrease in estradiol did not attain the critically low levels for a masculinisation to occur. It is plausible that the difference in temperature-sensitivity of the steroid-producing cells and/or germ cells between the Chitralada strain and our strains where masculinisation occurs is the threshold of estradiol production. In our strains temperature induces a decrease below the female threshold so that sex-reversal occurs but in contrast, in the Chitralada strain high temperature just decreases the estradiol levels without attaining the critical threshold.

In conclusion, we have sterilised tilapia female fry with 37°C treatments for 60 days without recolonization of the gonad. In contrast, in juveniles only a partial sterilisation was observed and it might be transitory. We encountered high mortalities which require better feed to improve conversions. Although a large variability was observed in the heat-sensitivity of the germ cells, presence of shrunken gonads was associated with depletion of germ cells by apoptosis and reduced somatic cell proliferation. Gene expressions showed that somatic cells are also affected by the 37°C-induced sterility. Masculinisation occurred in some treated fish

which may stem from temperature sensitivity causing decreased estradiol levels but not due to the germ cell depletion.

MATERIAL AND METHODS

Fish experimentation

Several all-female XX progenies were produced from the Manzala or the Bouake strains by crossing normal XX females with XX males (obtained by 17methyltestosterone treatment of fry) (D'Cotta *et al.*, 2001). After a natural fertilization the eggs were collected from the mother's mouth at 8 days post-fertilization (dpf) and then incubated in bottles at 27 °C, kept at constant photoperiod (12:12) and fed *ad libitum* from 10 dpf onwards. Temperature treatments of 37°C were applied gradually within three days to fry and juveniles for either 30 or 60 days and compared to a 27°C subgroup. Fish were sexed at 4 to 6 months after the end of each treatment (MAT), the sterility verified and in juveniles the gonad-somatic index calculated (gonad weight*100/body weight).

For the fry experimentations (Fry), the fish were separated at 10 dpf into two subgroups of 27°C (Fry-27°C) and 37°C (Fry-37°C). Fish trunks and later gonads were sampled (n=6-8) at 4, 7, 15, 30 days and 60 days (70 dpf) of treatment (DT) for RNA extraction in RNA later, and gonads fixed overnight in 4% (w/v) paraformaldehyde at the time of sexing for histology observation and immunohistochemistry.

A juvenile XX progeny (Juv) was also treated at 110 dpf to 37°C (Juv-37°C) for 60 days and sampled for RNA, histology and immunohistochemistry analysis at the end of the treatment (60DT=170 dpf) and two months after (2MAT=240 dpf).

Gonad histology and immunohistochemistry analysis

Fixed gonads were dehydrated and embedded in paraffin. Three fish per treatment were embedded, and serial transversal sections of the gonads were performed at 4µm thickness. Four slides per fish were performed containing each two to three sections. A slide was stained with hematoxylin-eosin for tissue observation, and the rest for VASA, PCNA immunohistochemistry and TUNEL assay.

To detect germ cells we used the rabbit anti-VASA-DDX4 / MVH antibody (GTX128306, GeneTex, USA) (a primordial germ cell marker) diluted at 1:200 incubated for 1 h, after having blocked with proteinase 1 for 4 min. This antibody was shown previously to

be specific to germ cells in both zebrafish and medaka. The number of proliferating cells was detected by hybridizing with the mouse anti proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (M0879, DakoCytomation, Denmark) diluted at 1:5000 incubated for 1 h, after having blocked with CC1 (Roche) followed with an ultrawash. Incubations were performed using the Benchmark automat (Roche-Ventana). The colour was detected with DAB (Ultraview) giving a brown labelling. Slides were then counterstained with hematoxylin giving a bleu staining.

TUNEL assay to detect gonad apoptosis

The detection of DNA fragmentation was analysed using In Situ Cell Death POD (Roche). Slides were deparaffinized and rehydrated in graded ethanol washes and then in PBS, and subsequently permeabilized by incubating slides with 20 µg/ml proteinase K for 11 minutes at room temperature. TUNEL staining was performed according to the manufacturer's protocols. Slides were subsequently washed in TPBS and then rinsed for 10 min in tap water, cleared and mounted in Citifluor MWL 4-88 Solution (Citifluor Limited, London, UK). Each TUNEL assay included a positive control consisting in a sample treated with DNase I to cause DNA fragmentation as well as a negative control lacking terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) in the TUNEL reaction mixture.

Image acquisition and cell counting

Images were scanned using the Nanozoomer 2.0 HT with light background without Z-stack at x20. Images were visualised with the NDPview2 software. Measurements of gonad width between 27°C and 37°C were performed from the NDPI images for the fry P3 progeny and juveniles. For the immunohistochemistry-DAB labelling, the cell counting of vasa was performed using the CellsCounter software from the NDPI images. Each image was segmented into homogenous sections using the WatersheedAlogarithm, counting the number of labelled cells *100 and subsequently the number of nuclei, and is given as a percentage.

For the TUNEL and PCNA the labelled area and the tissue area were calculated to obtain the percent labelling as :

$$\% \text{ labelling} = (\text{labelled brown surface area } (\mu\text{m}^2) * 100) / \text{tissue area}(\mu\text{m}^2))$$

RNA extraction and cDNA conversion

Total RNA was extracted from trunks and gonads using TRIzol (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) following the manufacture's protocol after homogenization with an Ultra-

Turrax (T10, IKA). RNA was resuspended in 20 to 50 µl H₂O, quantified using a nanodrop (BioWaveII, WPA, Cambridge, UK) and RNA integrity analyzed on a 1% agarose gel. Two µg of total RNA were then treated with 0.5U Turbo DNase (Ambion, Austin, TX, USA) for 30 min at 37°C to remove residual genomic DNA and the enzyme inactivated by EDTA and a 15 min incubation at 70°C. The cDNA was synthesized using oligo (dT)₁₂₋₁₈ with the SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and RNaseOUT (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), carried out at 42°C for 60 min with a subsequent inactivation at 70°C for 15 min. The cDNA was then diluted to 20 ng/µl prior to the PCR quantification.

Transcript quantification by real-time PCR

Transcript expressions were quantified by real-time PCR on a Stratagene MX3000P QPCR system (Stratagene, La Jolla, CA). The primers were: *cyp19a1a*, F1462: CTACTTTCAGCCGTTTCGGTTCAG and R1744: GTTCGGGTCTCGGAGGGTTTG; *amh*, F358: CCACAGTAACCGAGTACTCAC and R640: GAACCAAAGTCTGTTTGTCAG; *ef1*, F1014: AGAACGTCTCCGTCAAGGAAAT and R1115: GATGATGACCTGAGCGTTGAAG; *vasa*, F1072: AGTTGCTTCAGTGAGATG and R1223: AGTGCTGACTCCACCATA. The *vasa* primers were designed to amplify irrespectively the short copy *vas-s* and the normal *vas* copy (Wessels *et al.*, unpublished data) identified by Kobayashi *et al.* (2002). Primers synthesized by Eurogentec (Eurogentec, Seraing, Belgium) were designed using Primer3 plus and run with a T_m of 60°C for the first 3 genes and 62°C for the *vasa* gene. The QPCR reactions were run in 10 µl with 300 nM of each primer using the Brilliant II SYBR® Green QPCR master mix kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), carried out with 40 ng cDNA per well and run in duplicates for each sample. The cycle parameters were: 95°C for 10 min, with 40 cycles of amplification at 95°C for 30 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 30 sec. The dissociation cycle at 95°C for 1 min, 55°C for 30 sec and 95°C for 30 sec confirmed that a sole product was obtained. Expression of all the cDNAs were quantified simultaneously for a same gene. For each QPCR reaction wells without template (None Template Control = NTC) were systematically amplified. Expression amounts were calculated as in Poonlapdecha *et al.* (2013) using the Mean Normalization Expression (MNE) taking into account the efficiencies for the target genes and using *ef1* as reference gene to normalize values. Relative expression amounts were then expressed as the % maximum MNE value (=MNE_{target} x 100 / MNE_{maximum}).

Statistical analysis

Data is presented as means \pm standard error of the mean (SEM). Significant differences were searched with the GraphPad Prism software using the Mann-Whitney test when comparing 2 sample groups and Kruskal-Wallis for three sample groups. Significant differences were considered at $P \leq 0.05$.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the Histalim Company and the PHIV-CIRAD platform for their contributions and histological analysis. We thank CIRAD DRS for MRA's PhD funding.

REFERENCES

- Baroiller JF, Chourrout D, Fostier A, Jalabert B. 1995. Temperature and sex chromosomes govern sex rations of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. J Exp Zool 273:216-223.
- Baroiller JF, Clota F. 1998. Interactions between temperature effects and genotype on *Oreochromis niloticus* sex determination. J Exp Zool 281:507.
- Baroiller JF, D'Cotta H. 2001. Environment and sex determination in farmed fish. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol 130:399-409.
- Baroiller JF, D'Cotta H, Bezault E, Wessels S, Hoerstgen-Schwark G. 2009. Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. Comp Biochem Physiol A Physiol 153:30-38.
- Bayir H, Kagan VE. 2008. Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis-there is nothing more practical than a good theory. Crit Care 12:206.
- Beardmore JA, Mair GC, Lewis RI. 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. Aquaculture 197:283-301.
- Bedford JM. 2015. Human Spermatozoa and Temperature: The Elephant in the Room. Biol Reprod 115:130658
- Benfey TJ. 2015. Effectiveness of triploidy as a management tool for reproductive containment of farmed fish: Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a case study. Aquaculture 7:1-19.
- Bezault E, Clota F, Derivaz M, Chevassus B, Baroiller JF. 2007. Sex determination and temperature-induced sex differentiation in three natural populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) adapted to extreme temperature conditions. Aquaculture 272:S3-S16.
- Bridges PJ, Brusie MA, Fortune JE. 2005. Elevated temperature (heat stress) in vitro reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. Domest Anim Endocrinol 29:508-522.

- Brown, J.L., and Chakraborty, P.K., 1991. Comparison of Compensatory Pituitary and Testicular Responses to Hemicastration Between Prepubertal and Mature Rats. *Journal of Andrology* 12(2):119-125.
- Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, Korach KS. 1999. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science*.286:2328-2331.
- D'Cotta H, Guiguen Y, Govoroun MS, McMeel O, Baroiller JF. 2001. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol Reprod Dev* 59:265-276.
- Devlin RH, Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208:191-364.
- diClemente N, Seroka A, Sonigo C, Pierre A, Taieb J, Grynberg M.2014. Anti-mullerian hormone: advances on its regulation and biological effects in women. *mt Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie* 16:3-15.
- Fraser T., Rønneseth A., Haugland G., Fjelldal P., IMayer I., Wergeland H. 2012. The effect of triploidy and vaccination on neutrophils and B-cells in the peripheral blood and head kidney of 0+ and 1+ Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolts *Fish & Shellfish Immunology*, 33: 60-66
- Glover KA, Pertoldi C, Besnier F, Wennevik V, Kent M, Skaala Ø. 2013 Atlantic salmon populations invaded by farmed escapees: quantifying genetic introgression with a Bayesian approach and SNPs. *BMC Genetics*14:74.
- Goto R, Saito T, Takeda T, Fujimoto T, Takagi M, Arai K, Yamaha E. 2012. Germ cells are not the primary factor for sexual fate determination in goldfish. *Dev Biol* 370:98-109.
- Guignon CJ and Magre S. 2006. Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: insights from models of germ cell depletion. *Biol Reprod* 74:450-458.
- Hartung O, Forbes MM, Marlow FL. 2014. Zebrafish vasa is required for germ-cell differentiation and maintenance. *Mol Reprod Dev* 81:946-61.
- Ijiri S, Kaneko H, Kobayashi T, Wang DS, Sakai F, Paul-Prasanth B, Nakamura M, Nagahama Y. 2008. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol Reprod* 78:333-341.
- Ito LS, Cornejo AM, Yamashita M, Strüssmann CA. 2008a. Thermal threshold and histological process of heat-induced sterility in adult pejerrey (*Odontesthes bonariensis*): a comparative analysis of laboratory and wild specimens. *Physiol Biochem Zool* 81:775-784.
- Ito LS, Takahashi C, Yamashita M, Strüssmann CA. 2008b. Warm water induces apoptosis, gonadal degeneration, and germ cell loss in sub-adult pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atheriniformes). *Physiol Biochem Zool* 81:762-774.

- Karaca AG, Parker HM, Yeatman JB, McDaniel CD. 2002. The effects of heat stress and sperm quality classification on broiler breeder male fertility and semen ion concentrations. *Br Poult Sci* 43:621-8.
- Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Nagahama Y. 2002. Two isoforms of vasa homologs in a teleost fish: their differential expression during germ cell differentiation. *Mechanisms of Development* 111:167-171.
- Kobayashi T, Nagahama Y. 2009. Molecular aspects of gonadal differentiation in a teleost fish, the Nile tilapia. *Sex Dev* 3:108-117.
- Kurokawa H, Saito D, Nakamura S, Katoh-Fukui Y, Ohta K, Baba T, Morohashi K, Tanaka M. 2007. Germ cells are essential for sexual dimorphism in the medaka gonad. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16958-16963.
- Lee KH, Yamaguchi A, Rashid H, Kadomura K, Yasumoto S, Matsuyama M. 2009. Germ Cell Degeneration in High-Temperature Treated Pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Sex Dev* 3:225-232.
- MajhiSk, Hattori RS, Rahman SkM, Suzuki T, Strüsmann CA. 2009. Experimentally induced depletion of germ cells in sub-adult Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*). *Theriogenology* 71:1162-1172.
- Morishima K, Yoshikawa H, Arai K. 2008. Meiotic hybridogenesis in triploid *Misgurnus* loach derived from a clonal lineage. *Heredity* 100:581-586.
- Nakamura M, Ryo Nozu R, Ijiri S, Kobayashi T, Hirai T, Yamaguchi Y, Seale A, Lerner D, Grau G. 2015. Sexual characteristics of high-temperature sterilized male Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zoological Letters* 1:21.
- Nishimura T, Tanaka M. 2014. Gonadal development in fish. *Sex Dev* 8:252-261.
- Oshima K, Morishima K, Yamaha E, Arai K. 2005. Reproductive capacity of triploid loaches obtained from Hokkaido Island, Japan. *Ichthyol Res* 52:1-8.
- Pandit NP, Bhandari RK, Kobayashi Y, Nakamura M. 2015. High temperature-induced sterility in the female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Gen Comp Endocrinol* 213:110-117.
- Paul-Prasanth B, Bhandari RK, Kobayashi T, Horiguchi R, Kobayashi Y, Nakamoto M, Shibata Y, Sakai F, Nakamura M, Nagahama Y. 2013. Estrogen oversees the maintenance of the female genetic program interminally differentiated gonochorists. *Sci Rep* 3:2862.
- Pfenning F., Standke A., Gutzeit, H.O. 2015. The role of Amh signaling in teleost fish - multiple functions not restricted to the gonads. *Gen Comp Endocrinol* 223:87-107.
- Piferrer F, Beaumont A, Falguière JC, Flajšhans M, Haffray P, Colombo L. 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293:125-156.

- Poonlaphdecha S, Pepey E, Canonne M, de Verdal H, Baroiller JF, D'Cotta H. 2013. Temperature induced-masulinisation in the Nile tilapia causes up-regulation of both *dmrt1* and *amh* expressions. *Gen Comp Endocrinol* 193:234-42.
- Raz E. 2000. The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development. *Genome Biol*1(3): reviews 1017.1–1017.6.
- Rockett JC, Mapp FL, Garges JB, Luft JC, Mori C, Dix DJ. 2001. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *BiolReprod*65:229-239.
- Saito D, Morinaga C, Aoki Y, Nakamura S, Mitani H, Furutani-Seiki M, Kondoh H, Tanaka M. 2007. Proliferation of germ cells during gonadal sex differentiation in medaka: Insights from germ cell-depleted mutant *zenzai*. *Dev Biol* 310:280-290.
- Salem M, Kenney PB, Rexroad III CE, Yao J. 2006. Molecular characterization of muscle atrophy and proteolysis associated with spawning in rainbow trout. *Comp Biochem Physiol. Part D Genom Proteom* 1:227-237.
- Sheynkin Y, Jung M, Yoo P, Schulsinger D, Komaroff E. 2005. Increase in scrotal temperature in laptop computer users. *Human Reproduction* 20 (2):452-455.
- Slanchev K, Stebler J, de la Cueva-Méndez G, Raz E. 2005. Development without germ cells: the role of the germ line in zebrafish sex differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4074-4079.
- Strüssmann CA, Saito T, Takashima F. 1998. Heat-induced germ cell deficiency in the teleosts *Odontesthes bonariensis* and *Patagonia hatcheri*. *Comp Biochem Physiol* 119A:637-644.
- Sun LN, Jiang XL, Xie QP, Yuan J, Huang BF, Tao WJ, Zhou LY, Nagahama Y, Wang DS. 2014. Transdifferentiation of differentiated ovary into functional testis by long-term treatment of aromatase inhibitor in Nile tilapia. *Endocrinology* 155:1476-1488.
- Thorstad EB, Fleming IA, McGinnity P, Soto D, Wennevik V, Whoriskey F. 2008. Incidence and impacts of escaped farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in nature. NINA Special Report 36. 110 pp.
- Uchida D, Yamashita M, Kitano T, Iguchi T. 2004. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comp Biochem Physiol A* 137:11–20.
- Yamamoto Y, Hattori RS, Kitahara A, Kimura H, Yamashita M, Strüssmann CA. 2013. Thermal and endocrine regulation of gonadal apoptosis during sex differentiation in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Sex Dev* 7:316-324.
- Yin Y, Hawkins KL, DeWolf WC, Morgentaler A. 1997. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl* 18:159-165.
- Yoshizaki G, Sakatani S, Tominaga H, Takeuchi T. 2000. Cloning and characterization of a vasa-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Mol Reprod Dev* 55:364-371.

Youngren KK, Coveney D, Peng X, Bhattacharya C, Schmidt LS, Nickerson ML, Lamb BT, Deng JM, Behringer RR, Capel B, Rubin EM, Nadeau JH, Martin A. 2005. The Ter mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours. *Nature* 435:360-364.

Wessels S, Hörstgen-Schwark G. 2007. Selection experiments to increase the proportion of males in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by means of temperature treatment. *Aquaculture* 272:S80-S87.

Wong TT, Zohar Y. 2015. Production of reproductively sterile fish: A mini-review of germ cell elimination technologies. *Gen Comp Endocrinol* S0016-6480(14)00475-4.

Chapitre 2 : Effets des températures stérilisantes sur les gonades mâles de tilapias du Nil, avant la différenciation et lors de la maturation sexuelle

Cette étude s'est déroulée en trois étapes, en parallèle des expérimentations à 37°C menées sur les femelles tilapias du Nil. La première étape a consisté en une description détaillée des types cellulaires germinaux et somatiques contenus dans les testicules des mâles tilapias du Nil contrôles élevés à 27°C, en tenant compte de données de la littérature (Schulz *et al.*, 2005). La deuxième partie regroupe les résultats des impacts des traitements à 37°C sur le développement testiculaire et ce travail a donné lieu à la soumission d'un article dans la revue Aquaculture. Enfin, des figures additionnelles des effets engendrés par la température élevée de 37°C sur les mâles traités sont présentées dans une dernière partie.

1. Description des types cellulaires testiculaires chez le tilapia du Nil

1.1. Structure du testicule

Les testicules matures du tilapia du Nil sont des organes pairs, de forme allongée ; ils se situent le long de la cavité péritonéale, en-dessous de la colonne vertébrale, et s'étendent de la base de la tête à la naissance de la nageoire caudale. Chaque testicule est divisé en 3 parties, de l'intérieur vers l'extérieur du testicule : 1) les **canaux spermatiques** (ou **spermatic ducts**), lieu de circulation des spermatozoïdes vers le canal excréteur qui débouche à l'extérieur entre le rectum et l'urètre ; 2) le **parenchyme testiculaire** (ou **testis parenchyma**), partie interne du testicule contenant les **tubules séminifères** (ou **seminiferous tubules**), les **cellules de Leydig** (ou **Leydig cells**) et le **compartiment intertubulaire** (ou **intertubular compartment**) ; 3) la **tunique albuginée (TA)**, à la périphérie de la gonade (**Figure 39A**). En coupe transversale, les tubules séminifères, de forme ovoïde, sont composés de la **lumière tubulaire** dans la partie centrale, entourée de **cystes de cellules germinales spermatiques**, à différents stades de différenciation, des moins différenciées les **spermatogonies** (ou **spermatogonia**) aux plus différenciées les **spermatides** (ou **spermatids**). Chaque cyste est entouré de **cellules de Sertoli** (ou **Sertoli cells**). Les différents types cellulaires germinaux peuvent être caractérisés selon différents critères : volume et diamètre nucléaire, volume cellulaire, nombre de cellules germinales par cyste, nombre de cellules de Sertoli par cyste, nombre de cellules germinales par cellule de Sertoli (Schulz *et al.*, 2005 ; Schultz *et al.*, 2010).

1.2. Types cellulaires germinaux (d'après Schulz *et al.*, 2005)

Les **spermatogonies de type A, immatures** (indifférenciées) **et matures** (différenciées), notées **SPGA** (**Figure 39B**). Elles sont essentiellement présentes à proximité de la tunique albuginée, et quelques-unes sont observables dans d'autres régions du parenchyme testiculaire. Ce sont de très grosses cellules (volume de $2.261 \mu\text{m}^3$), reconnaissables par leur gros noyau ($10.1 \mu\text{m}$ de diamètre et un volume de $548 \mu\text{m}^3$) très distinct du cytoplasme abondant ($1.712 \mu\text{m}^3$). Une seule SPGA est présente par cyste, à raison d'une SPGA par

cellule de Sertoli. Après la seconde division mitotique, 4 clones identiques de spermatogonies B sont produits à partir de chaque spermatogonie A (Schulz *et al.*, 2005).

Les **spermatogonies de type B**, notées **SPGB (Figure 39B)**. Sept générations de SPGB ont été identifiées par Schulz *et al.* (2005) chez le tilapia du Nil (SPGB1 à SPB7). Ce sont encore de grosses cellules, mais plus petites que les **SPGA**, avec un volume cellulaire moyen de $477 \mu\text{m}^3$ et un volume cytoplasmique deux fois plus abondant ($322 \mu\text{m}^3$) que le volume nucléaire ($155 \mu\text{m}^3$). Le diamètre nucléaire moyen est de $6,5 \mu\text{m}$. Deux à trois cellules de Sertoli sont présentes dans chacun des cystes qui contiennent très peu de cellules germinales au stade SPGB1 (une unique CG), mais de nombreuses cellules germinales au stade SPGB7 (114CGs).

Les **spermatocytes primaires**, notés **SPI (Figure 39C)**, sont en mitose, du stade préleptotène au stade diplotène. Ce sont des cellules de taille moyenne, ayant des volumes cellulaire, nucléaire et cytoplasmique, légèrement plus élevés pour les stades pachytène et diplotène (respectivement $274 \mu\text{m}^3$, $124 \mu\text{m}^3$, $150 \mu\text{m}^3$), comparés aux stades préleptotène et leptotène/zygotène (respectivement $141 \mu\text{m}^3$, $72 \mu\text{m}^3$, $69 \mu\text{m}^3$). Les cystes comportent en moyenne 209 cellules germinales et cinq à six cellules de Sertoli, soit 37 CGs par cellule de Sertoli.

Les **spermatocytes secondaires**, notés **SPII (Figure 39C)**, ayant débuté la méiose, sont des cellules dont le volume cellulaire est plus restreint ($107 \mu\text{m}^3$). Les cystes contiennent de nombreuses SPII (389 CGs), et en moyenne six cellules de Sertoli, soit 64 CGs par cellule de Sertoli.

Les **spermatides**, notées **St (Figure 39D)**, sont de très petites cellules dont le volume cellulaire moyen est de $32 \mu\text{m}^3$. Elles sont reconnaissables par leurs volumes nucléaires ($11 \mu\text{m}^3$) et cytoplasmiques ($21 \mu\text{m}^3$) réduits. De nombreuses cellules germinales (environ 658 CGs) et en moyenne six cellules de Sertoli sont observables dans chacun des cystes, soit 100 spermatides mûres par cellule de Sertoli.

D'une façon générale :

- le diamètre nucléaire ainsi que les volumes cellulaire, cytoplasmique et nucléaire diminuent progressivement du stade spermatogonie A au stade spermatide mûre, exceptés aux stades spermatocytes primaires pachytène et diplotène où ces facteurs sont en augmentation ;
- inversement, le nombre de cellules germinales par cyste et le volume cystique augmentent constamment du stade spermatogonie A au stade spermatide précoce.

Ensuite, ces deux facteurs diminuent progressivement du stade de différenciation spermatide intermédiaire au stade spermatide final ;

- le nombre total de cellules de Sertoli par cyste augmente significativement à partir du stade de différenciation en spermatogonie B et continue sa progression jusqu'au stade spermatocytes primaires Leptotène/zygotène (L/Z), pour ensuite se stabiliser dans les cystes des spermatocytes primaires pachytènes aux spermatides matures.

1.3. Types cellulaires somatiques

Les cellules de Sertoli, notées **SC (Figure 39B)**, sont les cellules de support de la lignée germinale. Elles sont trouvées uniquement au niveau des cystes de cellules germinales. Elles secrètent des facteurs dont l'hormone *amh* qui participe au développement testiculaire. Elles ont également un rôle dans l'élaboration du liquide séminal.

Les cellules de Leydig, notées **LC (Figure 39D,E)**, forment de gros amas cellulaires, aussi appelés clusters, et sont situées dans l'espace interstitiel qui sépare les tubes séminifères. Elles sont caractérisées par un gros noyau et un cytoplasme abondant contenant de nombreux granules de réticulum endoplasmique lisse et de mitochondries avec un cristallin tubulaire, caractéristiques d'une stéroïdogénèse active. Les LC sont trouvées uniquement à côté d'autres LC ou des cellules myoïdes péritubulaires.

Les cellules myoïdes péritubulaires (ou myoidcells), notées **myf**, sont préférentiellement observées à la périphérie gonadique. Elles ont une forme très allongée caractéristique des cellules musculaires lisses et s'associent entre elles pour former plusieurs couches cellulaires, constituant la tunique albuginée.

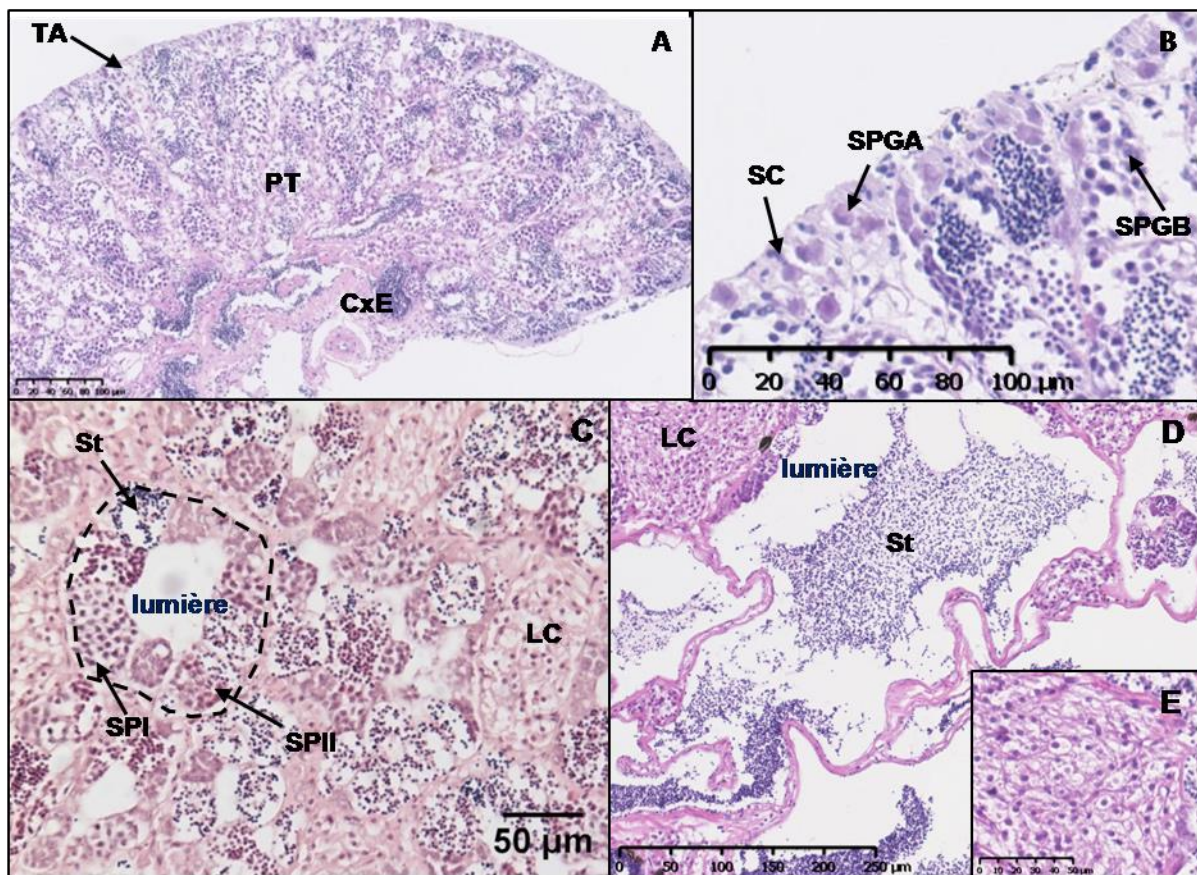


Figure 39. Visualisation de la structure et des différents types cellulaires testiculaires. A : Coupe transversale représentant la structure d'un testicule mûre. B-D : Coupes transversales regroupant les cellules de la lignée germinale mâle et somatiques. E : amplification de D représentant un cluster de cellules somatiques de Leydig. TA : tunique albuginée, PT : parenchyme testiculaire, CxE : canaux efférents, SPGA : spermatogonie de type A, SPGB : spermatogonie de type B, SPI : spermatocyte I, SPII : spermatocyte II, St : spermatides, SC : cellules de Sertoli, LC : cellules de Leydig. La ligne en pointillée noire entoure un tube séminifère englobant des cystes de spermatocytes et de spermatides.

2. Article n°2 : Etudes des impacts morphologiques et expressionnels générés par des températures élevées sur les cellules germinales et de Sertoli dans les gonades de mâles tilapias du Nil

2.1. Contexte, objectifs de l'étude et questions posées

La reproduction peut affecter négativement plusieurs critères importants pour la pisciculture. Dans beaucoup d'espèces, la maturation sexuelle engendre une réduction du taux de croissance, comme observé chez les femelles de tilapias (Baroiller *et al.*, 2009) ou une baisse

de la qualité de la chair accompagnée de l'augmentation de la mortalité due à une plus faible résistance aux pathogènes chez les saumons mâles (Karlsen *et al.*, 2004 ; Salem *et al.*, 2006). La stérilité des espèces piscicoles est recherchée en aquaculture parce qu'elle pourrait surmonter ces inconvénients et ainsi permettre l'augmentation de la productivité. La stérilisation permettrait aussi de mieux protéger la biodiversité, en éliminant les problèmes associés à l'évasion des individus domestiques dans le milieu naturel, en évitant le croisement possible de spécimens domestiques avec des spécimens sauvages (Glover *et al.*, 2013). La triploïdisation est actuellement la méthode la plus utilisée pour produire des individus stériles, mais elle provoque beaucoup de mortalités et un faible taux de succès d'obtention d'individus triploïdes chez certaines espèces (Piferrer *et al.*, 2009). De plus, c'est une technique coûteuse qui pourrait être difficile à introduire dans certains pays et les manipulations chromosomiques suscitent des problèmes d'éthique chez les consommateurs qui associent faussement ces triploïdes à des organismes génétiquement modifiés (OGMs).

Les tilapias constituent le deuxième groupe de poissons le plus cultivé dans le monde et représentent donc un intérêt économique majeur pour l'aquaculture. Le tilapia du Nil a un système de déterminisme génétique du sexe XX/XY, mais dont le phénotype sexuel peut être influencé par la température (Baroiller *et al.*, 2009). Des hautes températures de 35-36°C induisent la masculinisation de femelles génétiques XX (Baroiller *et al.*, 1995 ; Baroiller *et al.*, 2009). Dans certains cas, les traitements par les températures masculinisantes ont aussi engendré des gonades anormales montrant des parties stériles chez 9 à 18% des individus provenant d'une même descendance (Baroiller et Clota, 1998). Ces effets pourraient être dus aux différences de degré de sensibilité à la température existant entre les souches, descendances et même entre les individus d'une même descendance (Baroiller et D'Cotta, 2001 ; Bezault *et al.*, 2007 ; Baroiller *et al.*, 2009). Les tilapias pourraient donc être utilisés comme modèle d'étude d'une stérilisation induite par les hautes températures, méthode alternative potentiellement plus acceptable que la triploïdisation. De plus, les effets des températures stérilisantes pouvant être analysés sur chacun des sexes par la production de descendances 100% XX ou 100% XY (Devlin et Nagahama, 2002 ; Baroiller *et al.*, 2009) présentent un avantage supplémentaire en faveur des tilapias.

Ce travail a consisté à étudier les effets des hautes températures stérilisantes sur le développement et le maintien de la gonade mâle en utilisant des descendances 100% XY, traitées aux hautes températures de 37°C pendant 60 jours, au stade alevin et au stade juvénile (**Figure 40**).

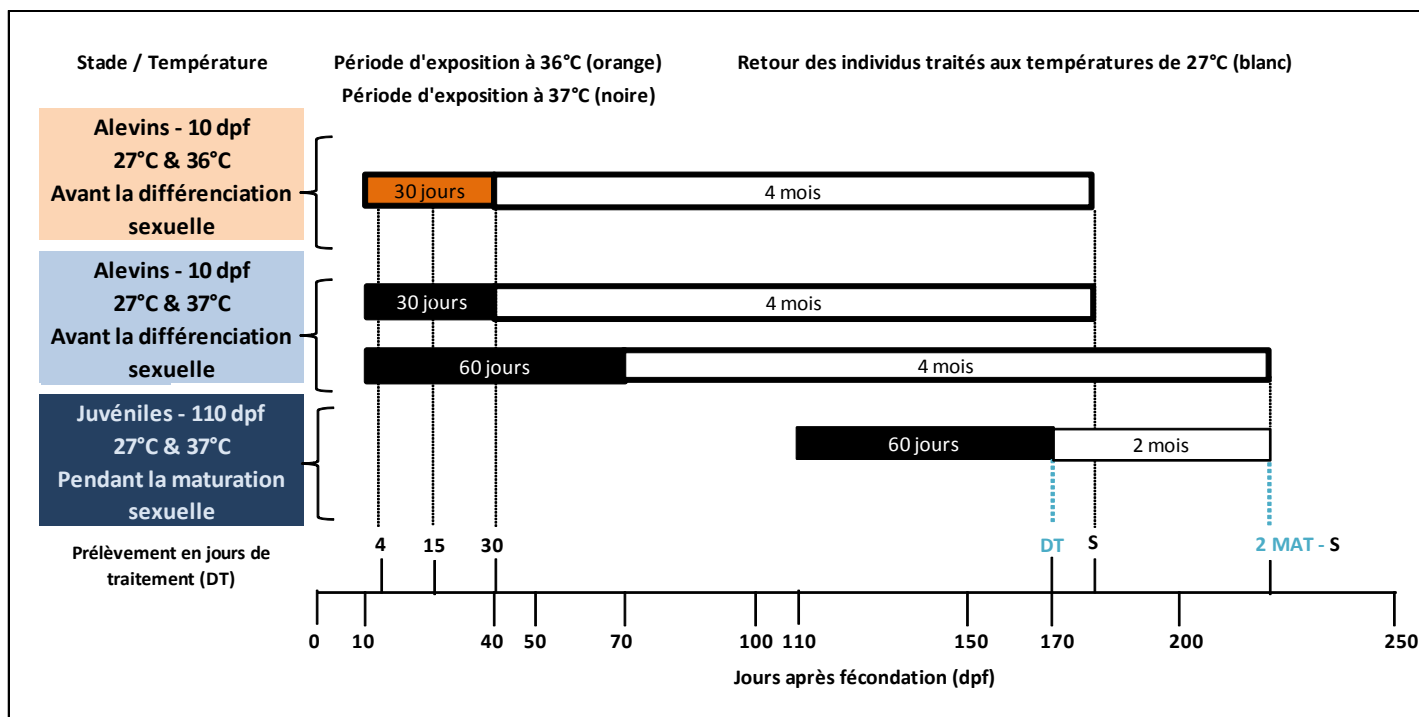


Figure 40. Diagramme schématique représentant les expérimentations aux fortes températures de 36 et 37°C sur des mâles génétiques XY tilapias du Nil alevins (10 dpf) et juvéniles (110 dpf). DT : jour de prélèvement, ET: fin du traitement, MAT: mois après la fin du traitement, S: sexage.

La présente étude a porté sur :

- **L'optimisation de la température et de la durée du traitement stérilisant.** Selon nos connaissances, un traitement à une température de 36°C de 30 jours masculinise des femelles génétiques XX de tilapias du Nil, et entraîne même dans certaines descendances un effet visible de stérilisation chez 9 à 18% des individus de quelques rares descendances (Baroiller et Clota, 1998). Est-ce suffisant pour un traitement stérilisant ou une température encore plus élevée de 37°C et/ou une durée plus longue de 60 jours sont-elles nécessaires ?
- **L'étude des effets du traitement stérilisant de 37°C sur les gonades des mâles génétiques XY traités avant leur différenciation sexuelle :** cette stérilisation est-elle complète et permanente ou bien partielle et transitoire ? En parallèle, des mâles juvéniles sont traités à 37°C pendant 60 jours afin de répondre à la question suivante : est-il plus facile de stériliser une gonade mâle avant la différenciation sexuelle, lorsque seulement une quarantaine de cellules germinales sont présentes dans la gonade, ou

cette stérilisation peut-elle également avoir lieu dans les testicules lors de la première maturation sexuelle ? L'analyse sera effectuée à différents niveaux (**Figure 41**):

- A l'échelle macroscopique : observation de la morphologie gonadique et des sex-ratios des différentes descendance lors du sexage 2 à 4 mois après la fin du traitement (2-4 MAT).
- A l'échelle cellulaire : visualisation de la structure cellulaire des gonades par histologie classique et confirmation de la perte des cellules germinales par immunolocalisation de la protéine Vasa et quantification de ce marquage.
- A l'échelle moléculaire : comparaison du profil d'expression de gènes marqueurs de types cellulaires, *vasa* (marqueur des cellules germinales), *amh* (marqueur des cellules de Sertoli et aussi impliqué dans la différenciation gonadique testiculaire) entre les mâles traités à 37°C (XY-37°C) et les mâles témoins à 27°C (XY-27°C).

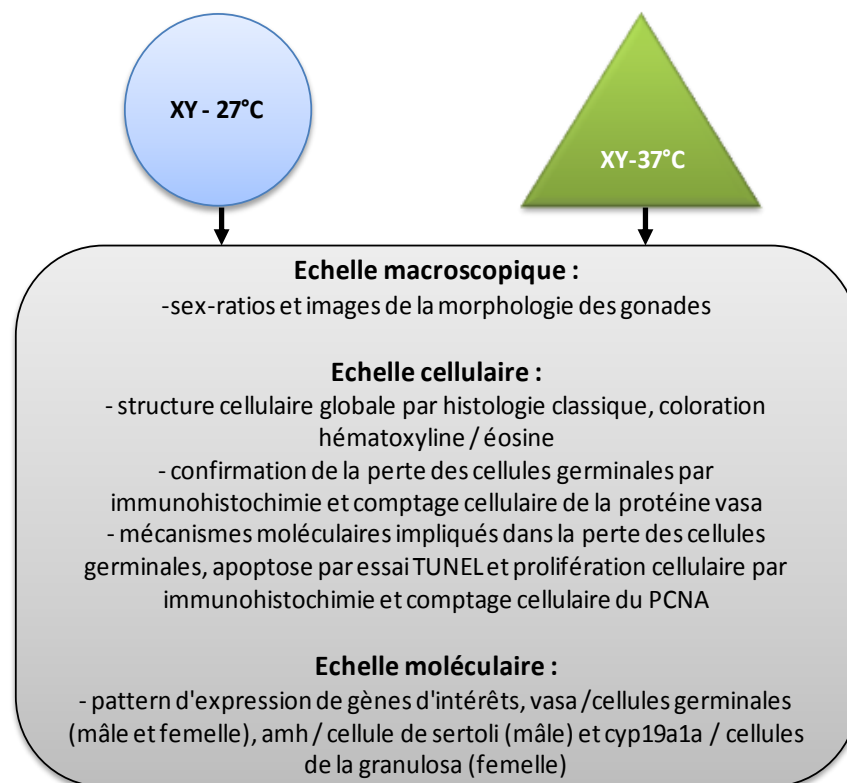


Figure 41. Etude de l'effet des traitements stérilisants de 37°C sur les gonades des mâles génétiques XY alevins et juvéniles de tilapias du Nil à différents niveaux et comparaisons des groupes traités XY-37°C avec les groupes témoins XY-27°C

- **Chez les mâles, existe-t-il une différence de sensibilité au traitement température de 37°C sur les cellules de la lignée germinale et les cellules de la lignée somatique ?**
- **L'étude des mécanismes pouvant être impliqués dans la disparition des cellules germinales dans les gonades des mâles traités à 37°C.** D'après nos précédents travaux (Almin *et al.*, 2015) et connaissances, il semblerait que l'apoptose cellulaire est impliquée dans la disparition des cellules germinales dans les gonades stériles. Nous nous sommes intéressés à la balance apoptose/prolifération cellulaire. L'analyse du taux d'apoptose est réalisée par essai TUNEL et celle de la prolifération cellulaire par immunohistochimie et quantification du PCNA (proliferating cell nuclear antigen).

2.2. Résultats majeurs

- Lors des sexages, nous avons comparé les pourcentages de stérilisation partielle ou complète entre les groupes d'alevins mâles (10 dpf) provenant de trois traitements différents : 36°C sur 30 jours, 37°C sur 30 jours et 37°C sur 60 jours (**Tableau 6**). Il s'est avéré qu'un traitement de 37°C pendant 60 jours est nécessaire pour induire la stérilisation des mâles tilapias du Nil.
- Le traitement 37°C a généré des impacts différents sur la morphologie gonadique des poissons traités. En effet, le traitement a touché les individus d'une même descendance à trois degrés d'intensité, visualisés par les 3 phénotypes gonadiques établis lors des sexages. Le premier phénotype gonadique " testis" n'a pas été impacté puisqu'il est similaire à celui des testicules des mâles témoins. La température de 37°C a eu un effet intermédiaire sur les gonades partiellement stériles (PSG) qui montrent des parties fertiles spermiantes, et d'autres complètement translucides. Par contre, le traitement a eu un effet maximal sur les gonades translucides (TSL). Les deux premiers phénotypes gonadiques, testis et PSG, sont retrouvés à la fois chez les alevins et les juvéniles traités. Par contre, seul le dernier, TSL, est complètement stérile. Il a été visualisé uniquement chez les juvéniles traités provenant d'une descendance mixte (XX/XY) et 100% XY, et représente respectivement 43% et 15% de ces gonades (**Tableau 6**).
- Le traitement 37°C a également eu un impact néfaste sur le taux de survie des groupes traités. Effectivement, le taux de survie des groupes Fry-37°C, de seulement 16 à 80%, est significativement plus bas que celui observé chez les Fry-27°C (97-98% ; $p < 0.001$)

; Tableau 1). Il en est de même pour les traitements 37°C de 60 jours réalisés sur les descendance juvéniles : 53% contre 95% pour la descendance mixte (XX/XY) et 67% contre 97% pour la descendance 100% XY ($p < 0.001$; **Tableau 6**).

- Les analyses histologiques ont montré que les testicules des groupes témoins Fry-27°C et Juv-27°C avaient une spermatogenèse active par la présence de nombreux cystes spermatiques à tous les stades de différenciation des spermatogonies A aux spermatides, ainsi que par la présence des cellules somatiques de Leydig dans les interstices entourant les tubes séminifères (**Figure 42D**). A la différence, les gonades TSL n'ont pas de structure cellulaire testiculaire claire et elles semblent dépourvues ou présentent très peu de CG. Par contre, du liquide séminal sans spermatozoïdes est visible dans la lumière des tubes séminifères et des canaux efférents. Des cellules de Leydig sont également présentes dans le tissu interstitiel (**Figure 42E**). Les gonades PSG alevins et juvéniles (**Figure 44B**) présentent une organisation testiculaire normale dans les parties spermiantes dites "fertiles" (**Figure 44C**), tandis que les zones translucides ou string-like montrent une structure cellulaire anormale, complètement désorganisée, semblable à celles des gonades stériles TSL (**Figure 44D**). L'hyper sécrétion de fluide visible dans les gonades traitées stériles TSL est le signe de la présence des cellules somatiques de Sertoli et révèle même la fonctionnalité de celles-ci. La baisse significative des transcrits *amh* (marqueur des cellules de Sertoli) visible dans les gonades des Juv-37°C apparaît donc contradictoire avec ce qui est observé histologiquement. Nous investiguerons différentes hypothèses pour expliquer cette observation dans la discussion.
- La protéine Vasa est visualisée par immunolocalisation dans les gonades mâles témoins Fry-27°C (couleur marron) et Juv-27°C (couleur bleue). Un signal intense est observé dans les cellules spermatiques précoces des spermatogonies A aux spermatocytes I. Ensuite, il décroît progressivement dans les spermatocytes II pour ne plus apparaître au niveau des spermatides et spermatozoïdes (**Figures 43C et 44E**). L'absence du signal d'immunolocalisation de Vasa nous a permis de démontrer que cette désorganisation testiculaire était en partie due à l'absence des cellules spermatiques dans les gonades juvéniles TSL (**Figure 43D**). La baisse significative du taux de cellules positives Vasa de 18.18% dans ces gonades TSL comparé à celui de $73.2\% \pm 0.8\%$ dans les gonades Juv-27°C confirme ce constat. Chez les Juv-37°C, la

baisse des transcrits *vasa* semble être corrélée avec la baisse du nombre de cellules germinales dans ces gonades.

- Chez les mâles tilapias du Nil, le traitement 37°C semble impacter de la même façon les gonades quand le traitement est appliqué soit avant la différenciation sexuelle, soit lors de la première maturation sexuelle.
- Il semblerait qu'une augmentation de l'apoptose soit à l'origine de la disparition des cellules germinales dans les gonades juvéniles partiellement stériles (**Figure 46**).
- Une inhibition de la prolifération cellulaire dans les régions dites "stériles " des gonades partiellement stériles (PSG, PSTL, PTSL, **Figure 44 M-P**) pourrait aussi faciliter cette déplétion en CG.
- Nous avons aussi observé une baisse significative de l'expression de gènes marqueurs de types cellulaires (*vasa*/marqueur CG - *amh*/marqueur cellules de Sertoli) dans les gonades juvéniles traitées à 37°C à la fin du traitement de 60 jours, mais également deux mois après la fin de ce traitement (**Figure 47**).

2.3. Discussion

Le traitement à 37°C a eu des impacts sur le développement gonadique des mâles tilapias du Nil, mais a également eu un effet néfaste sur la survie des individus traités aux stades alevin et juvénile. Toutefois, nous avons pu observer une survie nettement meilleure chez les Juv-37°C, avec un taux de survie moyen de 60% contre seulement 16% chez les Fry-37°C (PY1). Sur la base de ces seules données, notre souche Manzala semble montrer une plus faible résistance à la température que la souche Chitralada utilisée par Pandit *et al.* (2015). Il est important de préciser que la souche Chitralada est une souche connue pour être non thermosensible. La première hypothèse est qu'un effet souche pourrait expliquer cette différence. Ce constat nous a amené à nous poser la question suivante : *faut-il faire un lien entre la thermosensibilité et une faible survie à 37°C ?* Cependant les travaux de Pandit *et al.* (2015 et communication personnelle de Nakamura) sur cette espèce ont montré que le traitement à 37°C induisait une diminution de la prise alimentaire et une augmentation du taux d'évacuation gastrique, se traduisant alors par une croissance plus faible et des mortalités plus importantes que chez les témoins. Pour remédier à cette faible efficacité alimentaire, Pandit *et al.* (2015) ont nourri leurs alevins et juvéniles avec un aliment très riche en protéines (>60%) utilisé généralement pour l'alimentation des crevettes (C-700 and 1000 Kyowa Hakko Kogyo, Japan). Lors du dernier traitement d'alevins mâles (PY3), nous avons

donc nourri les lots témoins et traités par un aliment beaucoup plus riche en protéines (63% pendant 2 semaines puis 56% pendant le reste du traitement). Bien que nous n'ayons pas eu le temps de répéter un tel traitement associé à une alimentation aussi riche, les survies obtenues dans le lot Fry-37°C sont bien meilleures (80% contre 93% chez le témoin 27°C) que celles obtenues en utilisant un aliment classique pour alevins de tilapia. Ce résultat conforte l'hypothèse que les importantes mortalités observées dans les autres lots (ainsi que dans les expérimentations réalisées chez les femelles) sont probablement davantage à relier à des aspects énergétiques qu'à une température létale. En outre, cette hypothèse expliquerait la meilleure survie des juvéniles comparée à celle des alevins (besoins protéiques plus importants pendant des stades critiques du développement précoce) dans les expérimentations réalisées avec un aliment ordinaire.

Ce présent travail ainsi que d'autres études menées chez le tilapia (Almin *et al.*, 2015 ; Nakamura *et al.*, 2015 ; Pandit *et al.*, 2015) font penser que pour obtenir une stérilisation complète et pérenne, la température minimale optimale doit être de 37°C et la durée du traitement de 45 à 60 jours. Dans cette présente étude, contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature (Nakamura *et al.*, 2015 ; Pandit *et al.*, 2015), la plupart des individus mâles (XY) tilapias du Nil alevins et juvéniles est touchée par un traitement aux fortes températures de 37°C, mais à différents degrés d'intensité. Nous avons ainsi démontré que, selon les descendances, des proportions différentes de gonades sont affectées par le traitement à 37°C. Le traitement 37°C de 60 jours a généré trois phénotypes gonadiques chez les descendances mâles, parmi lesquels seul le phénotype translucide (TSL), était complètement dépourvu en cellules germinales. Cette macroscopie gonadique atypique a également été mise en évidence par Nakamura *et al.* (2015) chez leurs mâles tilapias du Mozambique stérilisés à 37°C. Le deuxième phénotype mâle (et femelle pour la descendance juvénile mixte) trouvé à la fois chez les descendances alevins et juvéniles (19 à 28%), indiquait que ces individus avaient des testicules ou ovaires normaux comparables à ceux des témoins, et par conséquent ne semblaient pas avoir été impactés par le traitement. Le phénotype intermédiaire, partiellement stérile (PS, PSTL ou PTSL), présentait des testicules partiellement stérilisés avec soit des portions fines, soit d'autres parties contenant du sperme. Cette stérilité induite est permanente dans la durée chez certains mâles traités à 37°C, alors que chez d'autres un développement gonadique testiculaire partiel ou total est visible, 2 à 4 mois après la fin du traitement. Ces observations sont en accord avec nos résultats trouvés lors d'expérimentations 37°C de 60 jours sur des descendances femelles alevins et juvéniles (Almin *et al.*, 2015). Ainsi, comme

pour le processus de masculinisation par les températures dans lequel des différences de thermosensibilité sont visibles inter et intra-espèce et entre individus, certains de nos poissons étaient totalement stérilisés par notre traitement à 37°C, tandis que d'autres ne l'étaient que partiellement voire pas du tout dans une même descendance. Selon les individus, la spermatogenèse semble plus ou moins sensible aux effets de la température. Il convient alors de se poser les questions suivantes : *dans les gonades totalement stérilisées, toutes les cellules germinales et cellules souches ont-elles été éliminées alors que dans les gonades partiellement stérilisées, seules les cellules germinales l'auraient été, mais pas toutes les cellules souches ? Est-ce que toutes ces familles ont la même fragilité des cellules germinales à un traitement température de 37°C ? Le seuil de température induisant une stérilisation est-il relié à la thermosensibilité d'une souche, d'une famille et/ou d'un individu ?*

Les analyses histologiques et d'immunolocalisation des protéines Vasa (marqueur des cellules germinales primordiales) et PCNA (marqueur de l'activité mitotique cellulaire) nous ont permis de montrer que les gonades partiellement stériles (PSG, PSTL et PTSL) possèdent des régions bien distinctes de par leur structure cellulaire. La portion dite "fertile" présente une structure testiculaire normale caractéristique et identique aux mâles témoins, avec de nombreux cystes spermatogoniaux, spermatocytes et spermatides et une activité mitotique intense. Au contraire, la zone dite "stérile" est complètement déstructurée, contenant très peu voire pas de cellules spermatiques et présente peu de renouvellement cellulaire. En accord avec les résultats de Nakamura *et al.* (2015), il est aussi intéressant d'observer histologiquement et par immunolocalisation de la protéine Vasa que les testicules stériles (TSL) sont dépourvus en cellules germinales. Cependant, une grande quantité de liquide séminal, sans spermatozoïdes, remplit les canaux efférents. Or, les cellules somatiques de Sertoli sont à l'origine de telles sécrétions de fluides dans la lumière des tubes séminifères. Cela suggère donc que les cellules de Sertoli sont non seulement fonctionnelles, mais peut-être même hyper-actives. Des cellules somatiques de Leydig, encore appelées cellules productrices de stéroïdes, sont aussi présentes dans les interstices.

La présente étude semble conforter le fait que les cellules germinales soient plus sensibles aux effets de la température de 37°C que les cellules somatiques de Sertoli ou de Leydig chez le tilapia du Nil. Nos résultats sont en accord avec ceux d'Ito *et al* (2008) qui ont montré que le premier signe histologique d'un traitement à la température sur le testicule de pejerrey était la disparition de tous les stades intermédiaires de la spermatogenèse entre les spermatogonies et les spermatozoïdes. Ce constat serait probablement dû à une plus grande

sensibilité des spermatocytes et spermatides qui meurent par apoptose cellulaire, et aussi au non renouvellement des spermatogonies par arrêt de la prolifération de ces cellules. L'observation de fluide dans la lumière des tubes séminifères et dans les canaux efférents atteste de la présence des cellules de Sertoli ainsi que de la fonctionnalité de celles-ci. La baisse significative d'expression de l'*amh* ne semble donc pas provenir d'un effet direct du traitement sur la fonctionnalité des cellules de Sertoli, mais plutôt d'un effet indirect résultant de la perte partielle ou totale des cellules germinales dans les gonades des individus traités. Ceci a pour conséquence l'arrêt des interactions entre cellules germinales et cellules de Sertoli qui sont normalement primordiales au bon déroulement de la différenciation et du maintien de la structure gonadique. La prolifération des cellules de Sertoli est directement dépendante de la prolifération des spermatogonies A et B car chaque cellule de Sertoli supporte un nombre pré-établi de cellules germinales. Si on s'en réfère à ce dernier schéma et aux résultats de Alvarenga et de França (2009), nous pouvons imaginer qu'il y a également baisse de la prolifération des cellules de Sertoli à cette température, dûe à la disparition partielle ou totale des cellules germinales. Par conséquent, nous pouvons émettre l'hypothèse que la baisse du profil d'expression du gène de l'*amh* chez ce groupe traité comparé au témoin pourrait résulter du nombre plus faible de cellules de Sertoli à 37°C. Une autre hypothèse peut-être formulée. L'*Amh* empêche l'initiation de la progression de la spermatogenèse, et par conséquent la différenciation des cellules spermatiques (Miura *et al.*, 2002). Les hautes températures engendrant une spermatogenèse rapide, un mécanisme d'inhibition de la transcription de l'*amh* pourrait avoir lieu afin de favoriser le processus de différenciation des cellules spermatiques à 37°C. De plus, la prolifération des cellules de Leydig n'aurait lieu qu'à des étapes spécifiques du cycle de reproduction annuel, lors de la maturation sexuelle ou bien encore lors de la régression testiculaire, chez certaines espèces de poissons (de Alvarenga et de França, 2009). Par conséquent, l'hyper prolifération des cellules de Leydig visible dans certaines parties de nos gonades traitées à 37°C pourrait être un signe de la régression du tissu testiculaire de ces individus.

2.4. Article n°2 : Les températures élevées génèrent des impacts morphologiques et expressionnels sur les cellules germinales et de Sertoli dans les gonades de mâles tilapias du Nil

**Elevated-temperatures generate morphological and expressional impacts
on germ cells and Sertoli cells of male gonads in the Nile tilapia
*Oreochromis niloticus***

(en cours de soumission dans la revue Aquaculture)

Marie-Raphaëlle Almin¹, Sandra Marroquín¹, Helena D'Cotta¹, Elodie Pepey¹, Marc Canonne¹ and Jean-François Baroiller^{*1}

¹UMR-ISEM (Institut de Science de l'Evolution de Montpellier), CIRAD, Montpellier, France, [*corresponding author : baroiller@cirad.fr](mailto:baroiller@cirad.fr)

Abstract

Sterility is a searched trait for aquaculture because reproduction affects negatively growth-rate, flesh quality or immune resistance. It is also a means to avoid genetic impacts on wild populations (gene-flow) resulting from the reproduction of farmed escapees. Elevated temperatures could be a means to induce sterilisation. High temperatures of 37°C were applied for 30 or 60 days to fry at 10 days post-fertilization (dpf) and juveniles (110 dpf) male of Nile tilapia and compared to 27°C. Macroscopically the gonads of 37°C-treated males were string-like (STL), translucent (TSL) or partially sterile (PSG). Treatment of fry resulted in partially sterile gonads whereas in juveniles completely sterile fish were found, and their gonadosomatic index GSI was lower than fish reared at 27°C. At the cellular level, the testicular morphology of TSL gonads were the most affected, with a disrupted organization and showing germ cell depletion. Spermatic fluid was observed in efferent ducts and Leydig cells seen in interstitial tissue. Total or partial depletion of germ cells was confirmed by Vasa immunolocalisation in TSL and PSG gonads. This cellular loss was due to apoptosis as assessed by TUNEL. In addition, *vasa* gene expressions were correlated with the lower amount of germ cells in 37°C treated gonads, particularly in juveniles. The Sertoli-marker *amh* gene remained low in juvenile 37°C males suggesting that the Sertoli cells may have also been affected either directly by the high temperatures or indirectly by the absence of germ cell interactions. In this study, we demonstrated that 37°C treatments cause partial or total germ cell depletion resulting in partial or complete sterility, according to the individuals and progenies.

Introduction

Sterility is a desired feature in aquaculture because reproduction can affect negatively several important traits. In many species, sexual maturation causes a reduction in growth rate (female tilapias; both sexes in cod), a decrease in flesh quality (male salmonids) and mortalities due to a decrease in immune resistance with higher susceptibility to pathogens (male salmonids) (Karlsen *et al.*, 2004 ; Salem *et al.*, 2006 ; Baroiller *et al.*, 2009). Commonly, producers eliminate the sex which grows slowly or matures faster either by hormonal treatments or indirectly by chromosome manipulations, to induce monosex progenies (Beardmore *et al.*, 2001; Devlin and Nagahama, 2002). Sterility can overcome these drawbacks and facilitate practices, increasing the productivity. Sterility is also a means to confine genetically selected fish lines. Therefore, sterility allows a protection of the biodiversity eliminating problems associated with farm escapees by avoiding possible interbreeding of domesticated or selected fish with wild specimens (Glover *et al.*, 2013).

Triploidisation is the main procedure currently in use to induce sterility but it can cause high mortalities with low success-rates in some species (Piferrer *et al.*, 2009) and might be difficult to implement in certain countries. Moreover, the complete sterility of male triploids is questioned at least in some species such as the tilapia since they have an apparently normal spermatogenesis (Razak *et al.*, 1999). As far as we know, no viable fry has ever been produced using spermatozoa from a 3n male tilapia. However natural triploid populations are found in other species. For example, wild triploid females of the Japanese loach *Misgurnus anguillicaudatus* can produce 3n and n eggs capable of being fertilised (Arai, 2001). Lastly, chromosome manipulation may cause problems for some consumers.

Tilapias are fish species for which the phenotypic sex is influenced by temperature (Baroiller *et al.*, 2009). They are important for aquaculture being the second most farmed fish group worldwide. Nile tilapia females have early maturation and present a lower growth-rate than males. Therefore, all-males are generally farmed and are mainly obtained by treating fry with androgens (Beardmore *et al.*, 2001). The Nile tilapia has a genetic XX/XY system with a sex-determinant still unidentified, but high temperatures of 35-36°C induce masculinisation of some XX individuals (Baroiller *et al.*, 1995 ; Baroiller *et al.*, 2009). In certain cases temperature treatments have resulted in abnormal gonads showing sterile portions, in 9 to 18% individuals (Baroiller and Clota, 1998). These effects could be due to differences in heat-sensitivity found between individuals of a same progeny, between progenies and also seen between strains or populations (Baroiller and D'Cotta, 2001; Bezault *et al.*, 2007 ; Baroiller *et al.*

al., 2009). These features together with the possibilities of generating 100% genetic all-male XY and all-female XX progenies (Devlin and Nagahama, 2002; Baroiller *et al.*, 2009) make tilapias ideal fish models to study alternative approaches other than triploidisation to sterilise aquaculture species.

Studies in several mammalian species (Rockett *et al.*, 2001) including humans (Sheynkin *et al.*, 2005) and in poultry (Karaca *et al.*, 2002) have shown that increased testicular temperature disrupts spermatogenesis inducing infertility. Treatments with high temperatures in fish have caused germ-cell degeneration in the fugu (Lee *et al.*, 2009), the zebrafish (Uchida *et al.*, 2004) as well as in the pejerrey (Strüsmann *et al.*, 1998 ; Ito *et al.*, 2008a et b). Some of these studies have shown that the process of germ cell death is through apoptosis. Loss of germ cells by temperature or by other means in zebrafish (Uchida *et al.*, 2004 ; Slanchev *et al.*, 2005), medaka (Kurokawa *et al.*, 2007) and fugu induced a sex-reversal of females into males, but this was not the case in the pejerrey (Ito *et al.*, 2008a et b). A better understanding of sterility induced by heat has become crucial. High temperatures are affecting fish fertility in wild populations as seen in the pejerrey *Ondontesthes bonariensis* captured in Patagonian Lakes during years of elevated temperatures, with gonads presenting germ cell depletion resembling those of laboratory fish treated to high temperatures (Ito *et al.*, 2008). Sterility induced by high temperatures is therefore a preoccupation in wild fish species in view of global warming.

Treatments with high temperatures of 37°C inducing sterility have recently been performed also in Nile tilapia females (Pandit *et al.*, 2015) and in the Mozambique male tilapias (Nakamura *et al.*, 2015). These treatments were effective in inducing germ cell degenerations if applied for 45 or 60 days to fry but extended durations were required for adults. Apart from monitoring the steroid levels, the processes leading to germ cell degeneration were not analysed in these fish. Decrease in sex steroid levels occurred in female Nile tilapia but after transfer to the control temperature (27°C) for extended periods, estradiol levels rose. In contrast, males showed no hormone-disruption. These studies suggest that the somatic cells are not affected by the 37°C temperature treatments. We have also treated female Nile tilapia to 37°C and induced germ cell degeneration showing apoptosis and decrease cell proliferation and our gene expression studies suggest that somatic cells are somewhat disrupted (Almin *et al.*, submitted). In addition, we evidenced large variability in temperature effects when using two different domesticated strains Bouake and Manzala.

The present work was performed to study the effects of 37°C temperature treatments in fry and juveniles males of Nile tilapia belonging to the Manzala strain known to be sensitive to temperature. The effect on the depletion of germ cells was assessed using immunohistochemistry with the vasa antibody and analysis of *vasa* transcript levels. In addition, we studied the processes of apoptosis and proliferation and, analysed the expression of the Sertoli-marker gene *amh*.

Materials and methods

Animals and samplings

Progenies are produced as described in D'Cotta *et al.* (2001) by crossing normal XX females with YY supermales. After artificial fertilisation, the eggs were incubated in bottles at 27°C and kept at constant photoperiod (12:12). Fish were fed *ad libitum* from 10 days post-fertilization (dpf) onwards. The high-temperature treatments of 37°C were applied to fry and juveniles with the temperature gradually increased within 3 days to 37°C. At the end of the treatment, the 37°C-treated fish returned gradually to the control temperature of 27°C until sexing. The sterility was verified and the gonado-somatic index (GSI) calculated [(gonad weight*100)/body weight] at the time of sexing.

Fry XY progenies (Fry) aged 10 dpf were separated into 2 groups: reared for 30 or 60 days to 27°C (Fry-27°C) and 37°C (Fry-37°C). Sexing were performed 4 to 8 months after the end of the treatment. Fish trunks of 4, 7, 15 days and subsequently gonads at 30 and 60 days of treatment (DT) were sampled in RNA later (Ambion, UK) for RNA extraction. At the time of sexing, gonads were sampled and fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde for histology and immunochemistry.

For juvenile experimentations (Juv), a progeny of mixed sex XX/XY individuals and a progeny of genetically all-male XY were treated at 37°C for 60 days. At 110 dpf, the juveniles from both progenies were divided into 2 groups of 70 fish each, the 27°C control (Juv-27°C) and the 37°C temperature (Juv-37°C) groups. Fish from the XX/XY and XY progenies were sampled at the end of the treatment (DT60 - 170 dpf) and at the time of sexing two months after the end of the treatment (2 MAT - 230 dpf) to verify whether the induced sterility was persistent. At each sampling dates, gonads of 6 to 8 fishes were dissected and kept in RNA later for RNA extraction and four gonads were dissected and fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde (PFA) for histology and immunochemistry analysis.

Gonad histology and immunochemistry analysis

Gonads were fixed overnight in 4% (w/v) paraformaldehyde, dehydrated and embedded in paraffin. Three fish per treatment were embedded, serially sectioned at 4µm in parallel or transversally to the gonadal axis. Four slides per fish containing two to six sections were selected. For observation, one of slides was stained with haematoxylin - eosin and the rest used for immunohistochemistry and TUNEL assay.

Germ cells were detected by hybridizing with the rabbit anti-VASA DDX4/MVH antibody (ab13840, abcam, Cambridge, UK) (a primordial germ cell marker) diluted at 1:200 incubated for 1 hr. We also hybridized slides with a second anti-vasa antibody (GTX128306, GeneTex, USA) which gave the similar signal localisations. Before this incubation with primary antibody, protein was removed with 0,1% (m/v) trypsin (Sigma) for 10 min at 37°C and blocked with 1% blocking buffer (Roche) for 1hr at room temperature. Incubations were performed using the In situ Pro Vsi automat (Intavis, Köln, Germany).

The number of proliferating cells was detected by using the mouse anti proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (M079, Dako, Cytomation, Denmark) diluted at 1:5000 and incubated 1 hr, after having blocked with the Roche CC1 blocking solution (Roche). Incubations were performed using the Benchmark automat (Roche-Ventana). The colour was developed with Vector Blue solution (secondary antibody-alkaline phosphatases 1:100) giving a blue labelling and with DAB (Ultraview) (secondary antibody-peroxydases 1:100) giving a brown labelling. Slides were then incubated with DAPI diluted 1:1000 for 5 min to observation and count nuclei. For negative controls, the primary antibody was replaced by normal rabbit or mouse serum.

TUNEL assay

The degree of DNA fragmentation in tilapia gonadal cells was quantified using two different commercially available kits : In Situ Cell Death POD (Roche) or DeadEnd™ Colorimetric TUNEL (Promega) system. Slides were deparaffinised, rehydrated in PBS and permeabilised by incubating with 20 µg/ml proteinase K for 11 min at room temperature. TUNEL staining was performed according to the manufacturers' protocols. Sections were then mounted in Citifluor MWL 4-88 Solution (Citifluor Limited, London, UK). A positive sample treated with DNase I to cause DNA fragmentation and a negative sample lacking terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) were included in the TUNEL reactions.

Image acquisition and cell counting

Slides were scanned using the Nanozoomer 2.0 HT de Hamamatsu with light background without Z-stack at x20 and images were observed with the NDPview2 software for automatic analysis. For manual analysis, slides were visualised with a Leica DM4500 microscope. Image acquisition was done at x40 with a Retiga 2000R camera (q imaging) using the Volocity acquisition software (Perkin Elmer) and images were then analysed with the Image J and Roi Manager softwares. For the immunohistochemistry-DAB revelation, PCNA-labelling surface was performed using the Cells Counter software from the NDPI images. Each image was subdivided into homogenous sections with the Watershed Alogarithm, calculating the % labelling = (the number of labelled cells * 100) / the number of total cells

For the immunohistochemistry-vector blue revelation of vasa, values are given as the percentage of vasa-labelling, calculated by dividing the number of Vasa-positive cells*100 with the number of total cells. For the TUNEL analysis, all images were analysed at X40 with the camera taking images at 1600x1200 pixels hence a total of 1.9×10^6 pixels, considering that 1 pixel corresponds to an area of $0.0335 \mu\text{m}^2$. The analysis was calculated as :% labelled area (μm^2) = (brown surface - area*100) / total area

RNA extraction, DNase treatment and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from trunks and gonads using TRIzol (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) following the manufacture's steps. Total RNA was re-suspended in 20 to 50 μl water. Two μg of total RNA were treated with 0.5 U Turbo DNase (Ambion, Austin, TX, USA) to remove residual genomic DNA at 37°C for 30 min. The enzyme was inactivated by adding 5 mM of EDTA and then incubated at 70°C for 15 min. The cDNA was synthesized with SuperScriptTMII reverse transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturer's recommendations, using oligo (dT)₁₂₋₁₈ primers (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and RNaseOUT (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), carried out at 42°C for 60 min with a subsequent inactivation at 70°C for 15 min. The cDNA was diluted to 20 ng/ μl for PCR quantification.

Real-time PCR quantification

Transcript was quantified by real-time PCR using a Stratagene MX3000P QPCR system (Stratagene, La Jolla, CA). The primers used were *amh*F358: CCACAGTAACCGAGTACTCAC and R640: GAACCAAAGTCTGTTTGTCAG; *efl*,

F1014: AGAACGTCTCCGTCAAGGAAAT and R1115: GATGATGACCTGAGCGTTGAAG; *vasa*, F1072: AGTTGCTTCAGTGAGATG and R1223: AGTGCTGACTCCACCATA. Primers were designed using Primer3 plus and synthesized by Eurogentec (Eurogentec, Seraing, Belgium). *Amh* and *efl* were run with a Tm of 60°C and *vasa* run at 62°C. The reactions were performed in 10 µl with 300 nM per primer using the Brilliant II SYBR® Green QPCR master mix kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), carried out using 40 ng cDNA per well and run in duplicates for each sample. Cycling parameters were: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 30 sec, 60°C or 62°C for 30 sec and 72°C for 30 sec, and then by a dissociation at 95°C for 1 min, 55°C for 30 sec and 95°C for 30 sec to verify that a single product was obtained. Expression of all the cDNAs were quantified simultaneously for a same gene. For each QPCR reaction, negative controls without template were systematically amplified. Relative expressions were calculated using the Mean Normalization Expression (MNE) using *efl* as reference gene to normalise values calculated using the equation (Poonlaphdecha et al., 2013): $MNE_{target} = (E_{reference})^{Ct_{reference}} / (E_{target})^{Ct_{target}}$ and then calculated as % maximum MNE value = $(MNE_{target} * 100) / MNE_{maximum}$

Statistical analysis

Data are presented as means ± standard error of the mean (SEM). Significant differences were calculated with the GraphPad Prism software. For expression and histological data, the non-parametric tests Mann-Whitney were used to compare two unpaired samples and Kruskal-Wallis used to compare three or more samples. Significant differences were considered at $P \leq 0.05$.

At the time of sexing, we used anova of GraphPad Prism software to search difference between all groups of sex-ratio. Significant differences were considered at $P \leq 0.05$. Chi-square test was used to compare survival rate. Significant differences were considered at $P \leq 0.05$.

Résultats

Effects of 37°C treatments on fish survival and gonad morphology

We initiated the 37°C treatments in parallel with a 36°C treatment, because previous results suggested that 36°C could also induce sterility at least in some rare progenies

(Baroiller and Clota, 1998). Fish treated to 37°C had in general lower survival rates than those reared at 27°C (table 6) with a severe mortality rate seen in two fry progenies treated for 30 days whether they were treated to 36°C or 37°C. Treated juveniles had less mortalities than fry. In contrast when a fry progeny (PY3) was fed 2 weeks with a 63% protein feed and subsequently with a 56% protein feed, significantly higher survival rates were encountered (80%) despite the fact that the duration of the treatment was for 60 days.

Analysis of the sex-ratios confirmed that all the fry progenies (Fry-27°C) and the juvenile PY4 progeny reared at 27°C were indeed all-male progenies with 98 to 100% males (table 6), with most of the individuals showing voluminous testes containing sperm, indicative of mature testis. Fry-37°C treated for 30 days including those treated at 36°C had similar testis morphologies and therefore, the treatments appeared to have had no impact on these fish. Similar GSI were indeed found between these two groups. The 37°C treatment for 60 days (Fry-37°C) however, resulted in 36% of the individuals showing partially sterile gonads (PS) with certain portions of the gonads being extremely thin or transparent (Fig. 42A) similarly to what was found in several Juv-37°C fish. The lower GSI found in these 37°C fish confirmed the treatment effect. Nevertheless, totally sterile fish were not found in this Fry-37°C progeny.

Table 1: Effects on XY male tilapia of 37°C treatments applied to fry and juveniles during 30 or 60 days											
Genotype	Progeny	Stain	Stage	Fish age dpf	Treatment	Treatment time	Sampling time (MAT)	Gonade (GP)	GP %	GSI	Survival rate (%)
XY	P1	Manzala	Fry	10	27°C	30	8	Testes	100	0,17 ±0,03	97
					36°C	30	8	Testes	98	0,17 ±0,009	35**
								Ovaries	2	2,53	
XY	P2	Manzala	Fry	10	27°C	30	2	Testes	100	0,20 ± 0,05	98
					37°C	30	2	Testes	100	0,24 ± 0,07	16**
XY	P3	Manzala	Fry	10	27°C	60	4	Testes	100	0,34 ±0,03	93
					37°C	60	4	Testes	64	0,29 ±0,01	80
								PS	36	0,23 ±0,03	
XX/XY	P4	Manzala	Juveniles	110	27°C	60	2	Male	56	0,19 ±0,04	95
								Female	44	2,02 ±0,04	
					37°C	60	2	Male	21	0,19 ±0,06	53**
								Female	7	0,08**	
								PSG	29	0,13 ±0,03	
XY	P5	Manzala	Juveniles	110	27°C	60	2	Male	100	0,36 ±0,04	97
					37°C	60	2	Male	19	0,27 ±0,05	67**
								PSG	66	0,19 ±0,04**	
								TSL	15	0,10 ±0,01**	

MAT = month after the end of the treatment, GP = Gonad Phenotype, PSG = Partially Sterile Gonad, TSL = Translucid Gonad, STL = String-like Gonad, GSI = GonadoSomatic Gonad, ** p < 0,005

Tableau 6. Sexage des descendance mâles et mixtes.

Treatments of 60 days appeared to have more effects on the gonads of juvenile fish (Juv-37°C) since completely sterile fish were found. We distinguished in several of the Juv-37°C two types of gonad morphologies, classified as translucent gonads (TSL) which could be more or less voluminous (Fig. 42B and C) appearing sometimes completely translucent (Fig 42B). While other supposedly sterile gonads were extremely small, thin and string-like (STL). The proportion of sterile gonads being either TSL or STL was higher (43%) in the mixed Juv-37°C PY4 than in the all-male Juv-37°C PY5 progeny of 15% (Table 6). This last progeny presented 19% normal males while the remaining 81% had gonads that were either completely sterile (15%) or partially sterile (66%) (table 6). Partially sterile gonads had testis' sections that were fertile while other regions were considerably narrower and elongated (Fig. 42A and 42B). The GSI of the TSL fish in the PY5 progeny was significantly lower 0.10 ± 0.01 ($p < 0.001$), than in normal or partially sterile males treated at 37°C with GSIs of 0.27 ± 0.05 and 0.19 ± 0.04 , respectively.

The sexing of the Juv-27°C controls from the XX/XY progeny PY4 revealed a balanced sex-ratio (Table 6) with normal maturing female gonads with some oocytes at different stages of development but mostly maturing follicles (44%) while the males (56%) had mature sperm-producing testes. The 37°C treated group had 7% normal females and 21% normal males (Table 6) while 72% of the fish presented in fact partial or total sterile testis. The mean GSI of the Juv-27°C females was 2.02 ± 0.04 while females treated to 37°C had a significantly lower GSI 0.08 ± 0.02 (Table 6). Significantly lower GSI (0.04 ± 0.01 , $p < 0.05$) was found also for the TSL/FIL individuals in this Juv-37°C progeny compared to the 27°C males (0.19 ± 0.04).

Effects of 37°- treatment on testicular histology

Histological observations showed that the gonads of the Fry-27°C and Juv-27°C groups had normal testis having an active spermatogenesis with seminiferous tubules containing numerous germ cell cysts at different stages of development: spermatogonia, spermatocytes and spermatids. The Leydig cells in the interlobular compartment were clearly visualized (Fig. 42D and 44A). In contrast, in the PS as well as partially STL and TSL gonads of the Fry-37°C we could distinguish two regions (Fig 44B), one apparently fertile similar to normal testis (Fig. 44C) and another disorganised section visibly lacking germ cells cysts or having reduced amounts with the efferent duct fluid

having no spermatozoa (Fig. 44B and 44D). These last sections corresponded to the gonad regions that were translucent or string-like in appearance (Fig. 42A and 42B).

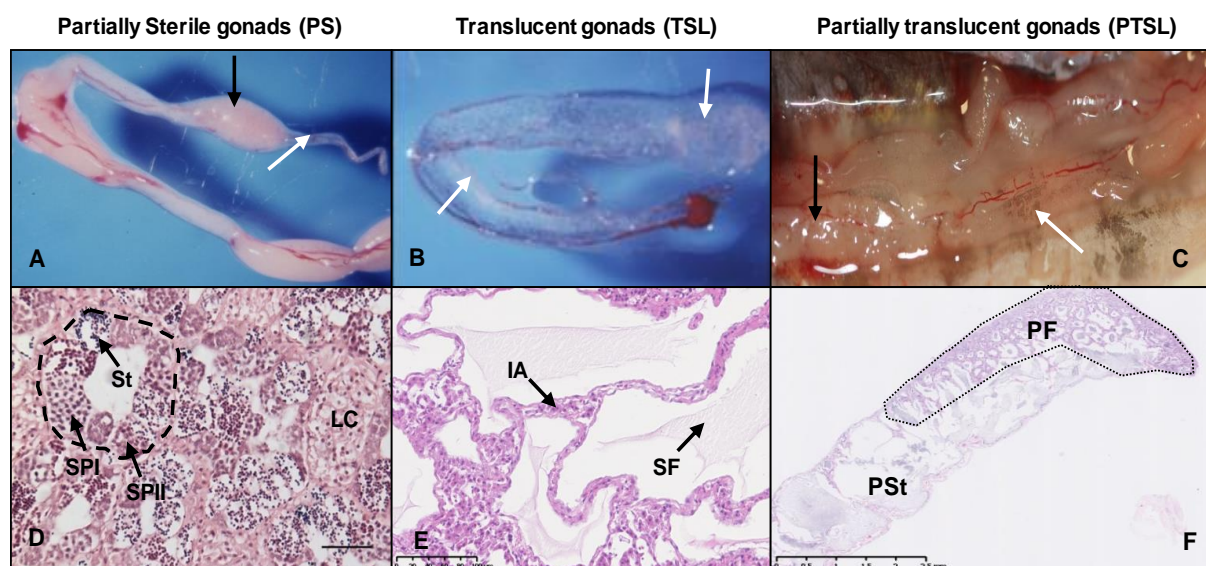


Figure 42. Gonad macroscopy and histological gonadal sections of 37°C fry-treated males for 60 days, at four months after the end of the treatment. A,B,C: Three gonads showing different degrees of sterilization at 37°C, partially sterile (PS – A), translucent (TSL – B) and partially translucent (PTSL – C) gonads. D,E,F: Hematoxylin/eosin staining. D: Section of a testis of a 27°C fish with lobules containing cysts of spermatocytes I and II (SPI, SPII) and spermatids (St), separated by interstitial tissue with epithelial and spermatogenic Leydig cells (LC). E: Section of a translucent gonad of a 37°C treated male with total cellular disorganization and absence of germ cells, showing interstitial area (IA) containing epithelial and Leydig cells and spermatic fluid (SF) lacking spermatozoa in the efferent ducts. F: Partially translucent gonad with two distinct parts, one fertile with many cysts of spermatic cells (PF, surrounded with a stippled line) and another apparently sterile section with absence of germ cell cysts (PSt). Black arrow: fertile spermatic part and white arrow: sterile translucent area. Scale bars: A-C=1 cm, D = 50 µm, E = 100 µm and F = 2,5 mm

In juveniles, the 37°C treated fish with either TSL or STL gonads had abnormal structures devoid or having a low number of germ cells. Although these gonads were depleted of spermatic cells, there was spermatic fluid without spermatozoa observed in the lumen of both seminiferous tubules and efferent ducts with Leydig cells observed in the interstitial tissue. In contrast, the PSG gonads had a similar histological morphology to that of normal males (data not shown).

Partial or total disappearance of germ cells in the 37°C gonads

Immunolocalisation of the Vasa protein stained in brown for the fry and in blue for the juveniles was visualised abundantly in the gonads of the 27°C fish. The staining was very intense in spermatogonia A and B as well as in spermatocytes I, decreasing progressively in spermatocytes II, and disappearing in both spermatids and spermatozoa (Fig. 43C and 44E). In the Fry-37°C progenies, we found absence of Vasa-staining in both the TSL or STL

sections confirming germ cell depletion in these areas despite being only partially sterile (Fig. 44F and 44H). In contrast, the fertile sections of these Fry-37°C fish presented vasa labelling similarly to the control testis thus confirming the presence of both spermatogonia and spermatocytes I cysts in these regions (Fig. 44F and 44G). However the quantification in these fry of the global surface stained with Vasa (Fig. 45A) did not show significant differences between the gonads of controls (3.45 ± 1.1 , $p>0.05$) and 37°C-treated fish (2.96 ± 0.09).

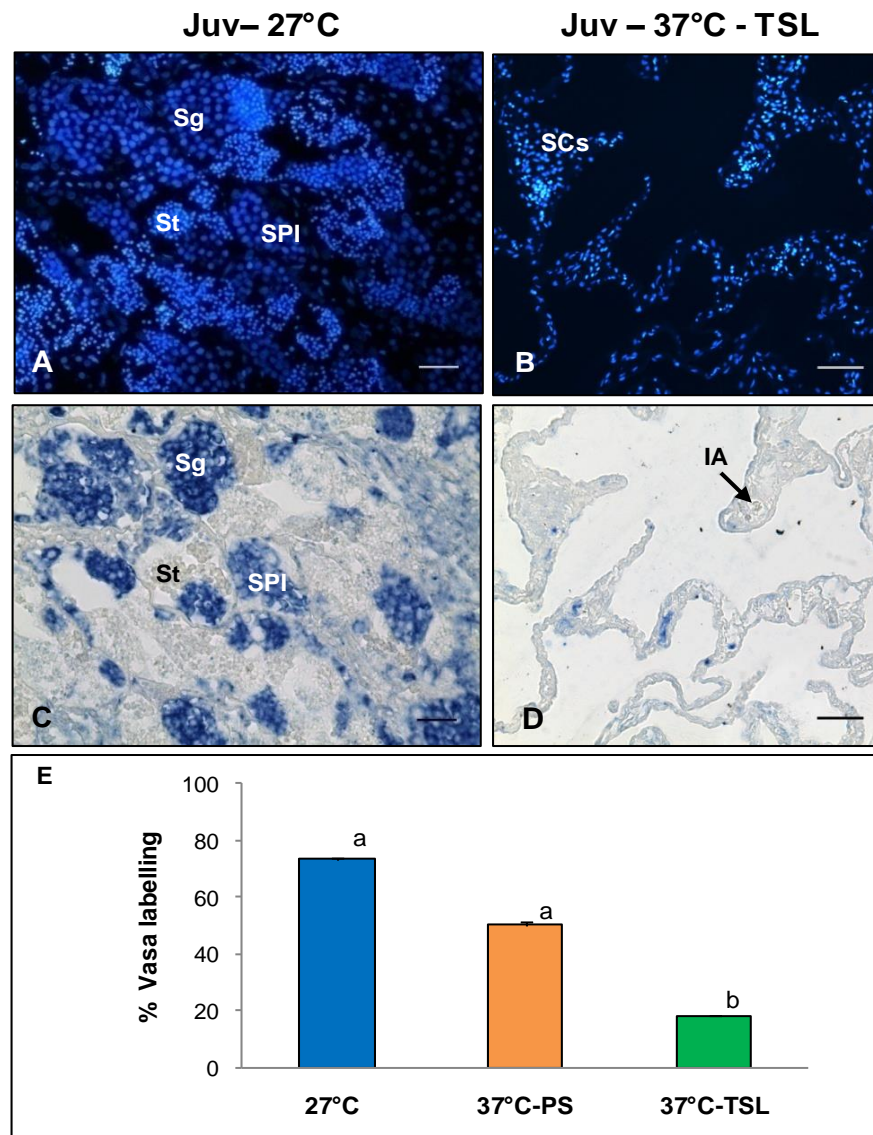


Figure 43. Treatment of 37°C in juveniles results in total germ cells depletion leading to permanent sterility in translucent gonads at two months after the end of the treatment. A,B: DAPI stained nuclei of all cellular types in control gonad (A, Juv-27°C) and in sterile translucent treated gonad (B, Juv-37°C-TSL). C,D: immunohistochemistry of Vasa-stained germ cells in a Juv-27°C gonad (C), with active spermatogenesis; Vasa protein is detectable in the cytoplasm of spermatogonia (Sg) and spermatocytes I (SPI) but absent in spermatocytes II and spermatids (St). In contrast, no signal is shown in Juv-37°C-TSL gonads (D), revealing total germ cell depletion, but interstitial area (IA) and somatic cells are seen. E: % of Vasa-immunopositive cells in juvenile male gonads. Each value represents the mean \pm SEM ($n=2-3$) and $n=1$ for PSG. Scale bar of A-D = 50 μ m. a significantly different from b with $p<0.05$.

In juveniles, the DAPI labelled the nuclei of all cells soboth the germ cells and the differentsomatic cells were stained (Fig 43A and 43B). The DAPI staining served to evaluate the total number of cells and then this was used to quantify the number of vasa-stained germ cells. The extremely low vasa-signals seen in both the TSL and the STL gonads (18.14%) of the Juv-37°C fish further confirmed the depletion of germ cells (Fig. 43D and 43E). In contrast, the partially sterile gonads had vasa-signals comparable to those of the Juv-27°C (Fig. 43C). No significant differences were found in the number of vasa-stained cells between the gonads of the 37°C-PS (50 ± 1.1) and the 27°C (73.2 ± 0.8) (Fig. 443E).

Analysis of apoptosis and cell proliferation

To detect apoptotic cells, we used the method of Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTPnick-end labelling (TUNEL) which visualizes fragmented DNA. Very low number of apoptotic cells was observed in the gonads in the Fry-27°C progenies (0.95 ± 0.2 , Fig. 44I) at 4 MAT. Similar staining was observed in both the fertile and the sterile regions of the partially sterile gonads of the Fry-37°C fish (Fig. 44J and 44K). Although a large amount of empty lumen was seen in the sterile portions (Fig. 44J and 44L), the overall TUNEL staining was reduced in these gonads. This observation was confirmed by the quantification of the proportion of TUNEL-positive surfaces and no significant difference was found between 27°C and 37°C groups (0.53 ± 0.03) (Fig. 45B). In the juvenile progenies many apoptotic cells were observed in the 37°C - PS gonads (Fig. 46B). In contrast, TUNEL-stained cells were extremelyreduced in both the 27°C controls and 37°C-TSL gonads (Fig. 46A and 46C). Quantification of the surface area labelled with TUNEL also showed similar values between the 27°C and 37°C-TSL gonads with 1.02 ± 0.3 and 2.1 ± 1.3 , respectively,while the PS gonads in the Juv-37°C had significantly highervalues (23.5 ± 5.8 , $P < 0.05$, Fig. 46D).

We also analysed the rate of cell proliferation in fry progenies by using the PCNA antibody. In the Fry-27°C gonads, abundant PCNA staining was seen of the nuclei of spermatogonia and spermatocyteswith some signal also seen in a few Sertoli cells (Fig. 43M). In the Fry-37°C fertile sections of the partially sterile gonads, similar PCNA cell labelling was observed to that of controls (Fig. 44N and 44O). In contrast, the TSL and STL sections of these gonads had only labelling of a few somatic cells (Fig. 44N and 44P). The overall quantification of the area of PCNA-labelled cells gave similar values between the Fry-27°C controls (5.83 ± 1.5) and the Fry-37°C gonads (5.16 ± 0.6) (Fig. 45C).

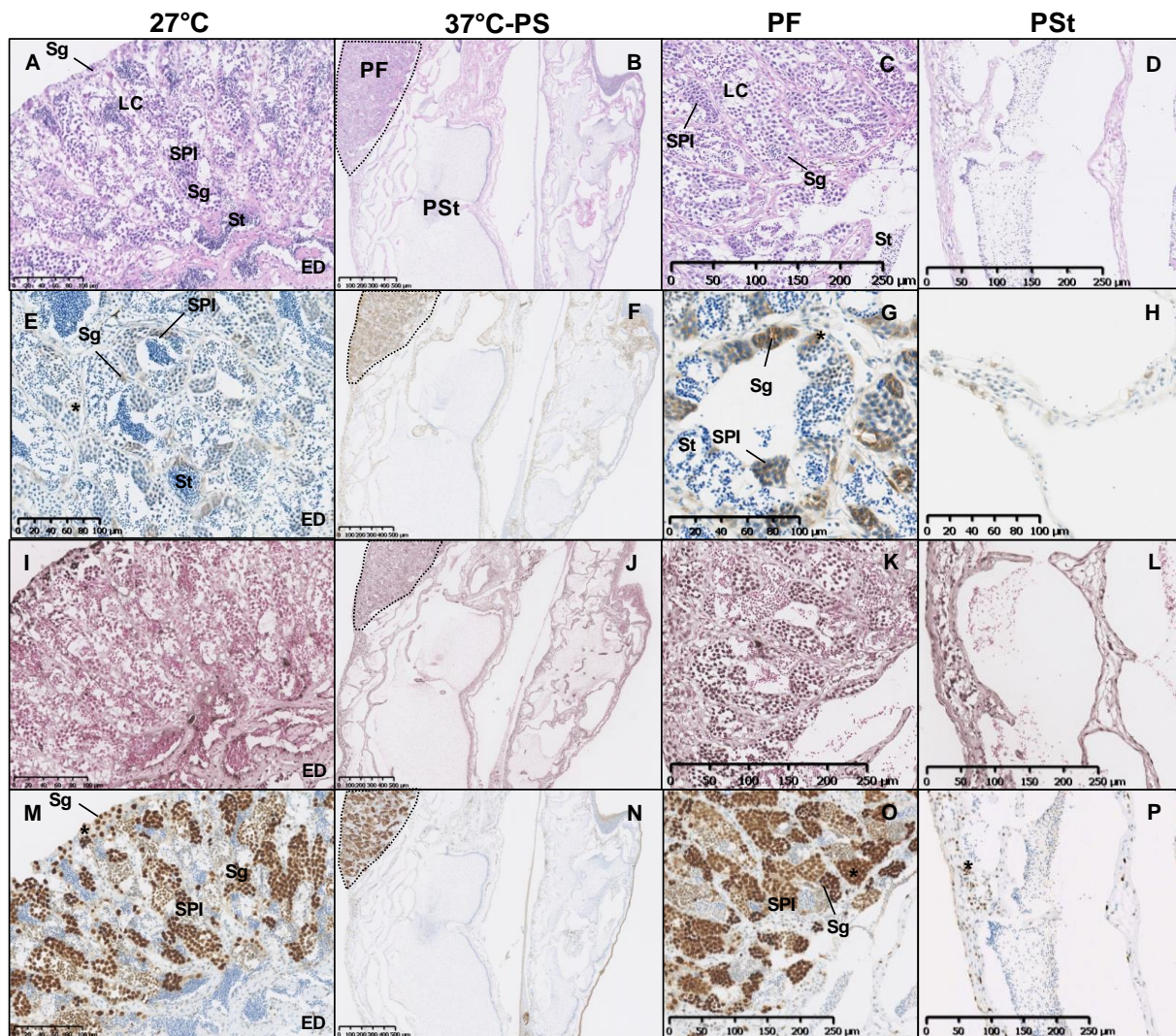


Figure 44. Histological sections of gonads from 37°C fry-treated males for 60 days at the time of the sexing, four months after the end of the treatment, with Vasa and PCNA immunolocalization and TUNEL activities. A-D: Hematoxylin/eosin staining, E-H: Vasa Immunochemistry, I-L: TUNEL assay, M-P: PCNA immunochemistry. A, D, G, J: Control male gonads at 27°C showed cysts of spermatogonia (Sg), spermatocytes (Sc), spermatids (St), efferent ducts (ED) and Leydig cells (LC) in interstitial tissue, representative of normal spermatogenesis. B, F, J, N: Partially sterile gonads (PS) of 37°C-treated fry where a fertile portion can be distinguished (PF, surrounded with a stippled line). C, G, K, O showing similar cellular structure to 27°C gonads and D, H, L, P a sterile portion (PSt) with absence of germ cells, but presence of interstitial tissue with somatic Leydig cells. Scale bars of B, F, J, N = 500 µm. Scale bar of C, D, K, L, O, P = 250 µm. Scale bar of A, E, G, H, I, M = 100 µm.

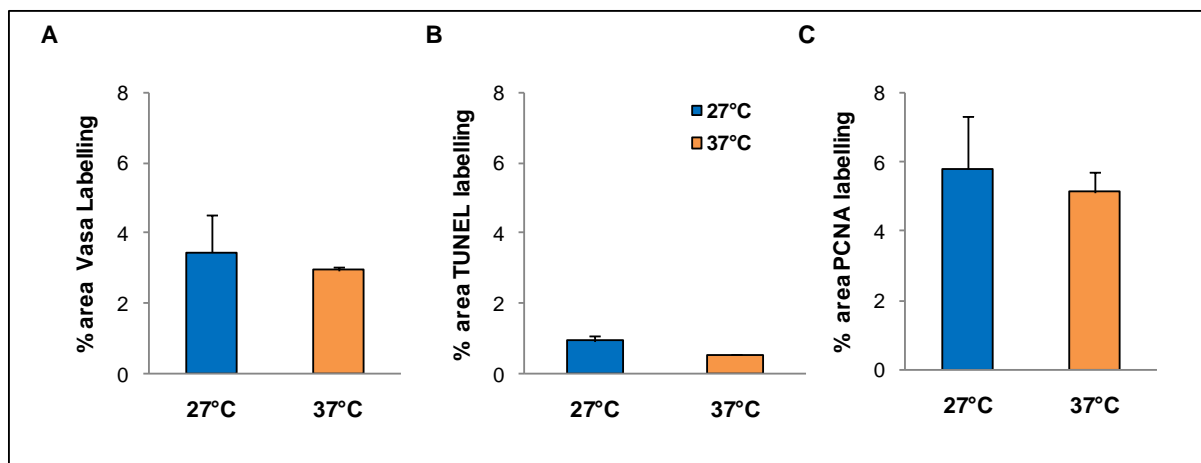


Figure 45. Quantification (%) of vasa-stained germ cells, apoptotic area and PCNA proliferating cells in gonads from 27°C reared males and 37°C fry-treated males for 60 days, at four months after the end of the treatment. A: % Vasa-immunopositive areas. B: % PCNA-immunopositive area. C: % gonad area labelling by TUNEL. Each value represents the mean \pm SEM (n=2-3); $p>0.05$.

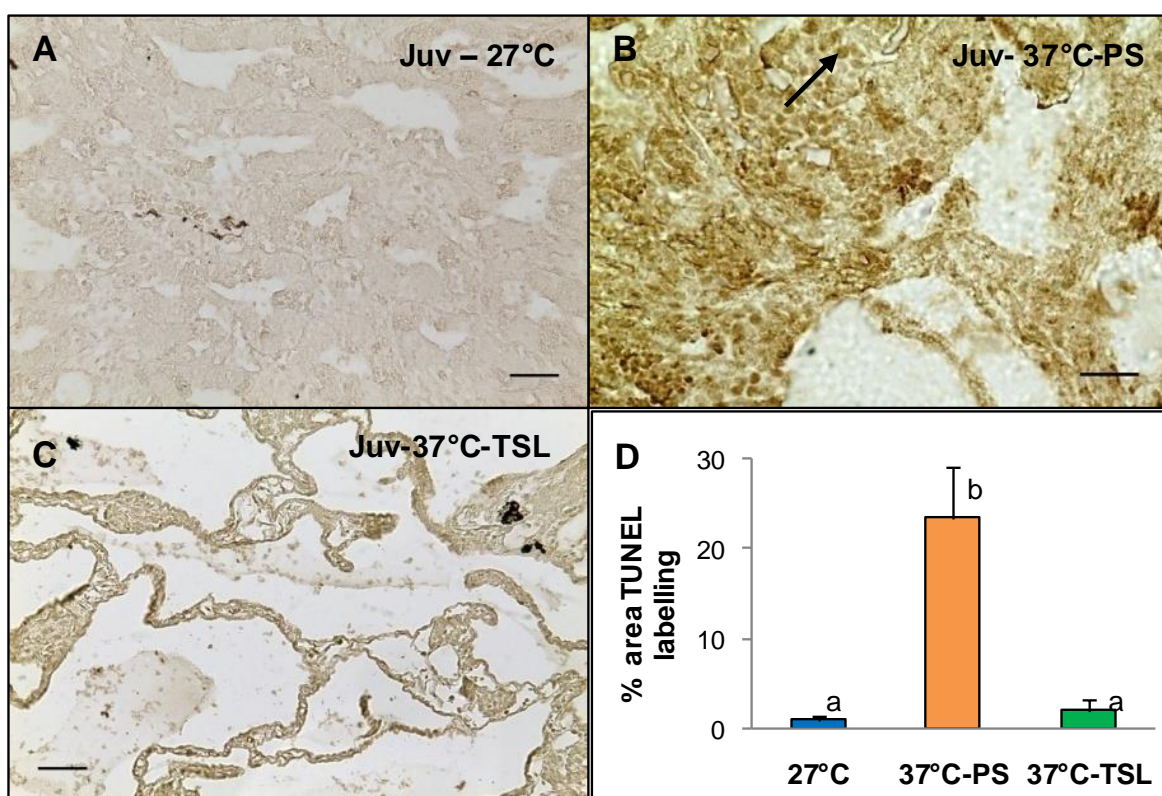


Figure 46. Apoptosis activity in male gonads of juveniles exposed to 37°C for 60 days at the time of the sexing, two months after the end of the treatment. TUNEL assay of a 27°C fish gonad (A – XY-27°C) and a partially sterile gonad of 37°C-treated males (B - 37°C-PS) and a translucent sterile gonad (C – SG-37°C-TSL). Apoptotic cells are shown with a black arrow. Each value represents the mean \pm SEM (n=2-3). Scale bar of A-C = 50 μ m. a significantly different from b with $p<0.05$.

Decrease in both vasa and amh gene expressions in juvenile treated fish

Transcript levels of the *vasa* gene, an additional marker of the germ cells, was also analysed in juvenile gonads. At the end of 60 days of treatment *vasa* expressions were low but levels were already significantly lower in the Juv-37°C (Fig. 47A). Two months later, *vasa* levels increased in both controls and 37°C treated fish but with more than 60% increase in the Juv-27°C. In addition, the gene expression of the Sertoli-marker *amh* was analysed. Levels were lower in the 37°C treated gonads but not significantly different at the end of 60 days of treatment (Fig. 47B). Levels in the 37°C treated gonads decreased further reaching significantly lower expression levels, two months later.

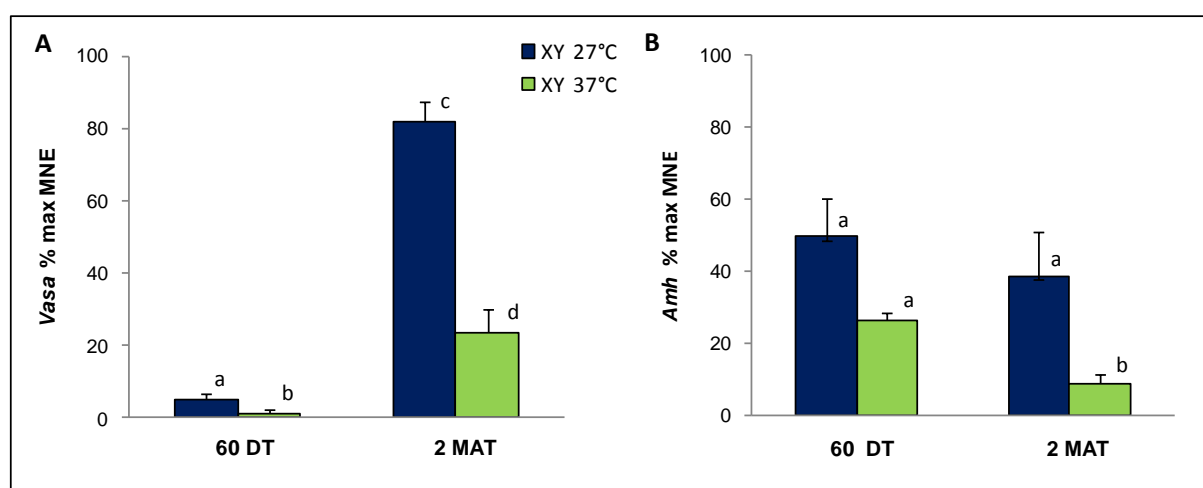


Figure 47. Relative expressions of the germ-cell *vasa* gene and the Sertoli-marker *amh* gene in XY juveniles. A: *vasa* gene expressions; B: *amh* gene expressions of gonads at the end of the 60 days of treatment (60 DT) and 2 months after the end of treatment (2 MAT). Each value represents the mean \pm SEM. (n=5-7), significantly different from b with $p < 0.05$.

Discussion

Survival rates have been strongly affected in our study by the 37°C treatment in both male fry and juvenile treated groups. In Fry-37°C fed with a classic feed we obtained only 16% of individuals that survived the treatment compared to 98% in the Fry-27°C control groups. Taking together the mixed and the male monosex progenies, 60 % survival rates were recorded for the Juv-37°C against 96% in the Juv-27°C. Therefore, male juveniles presented a better tolerance than the male fry to a heat treatment. The survival rates with 37°C treatments applied for 30 days to male fry (16%) was similar to what we observed for females (Almin *et*

al., 2015). For juveniles, survival rates were slightly better in males (67%) than in females (41%) for 60-day treatments.

When considering the biology and ecology of Nile tilapia, these strong impacts of high temperature treatments on survival are somewhat surprising. Indeed, various field studies have reported the presence of Nile tilapia populations in water bodies where temperatures were higher than 40°C (Trewavas, 1983 ; Bezault *et al.*, 2007 ; Nyingi *et al.*, 2009 ; Kavembe *et al.*, 2014). Moreover, our group has also demonstrated that during the daytime wild fry shoals/juveniles mainly stayed in shallow waters where temperatures are frequently higher than 34-36°C (Bezault *et al.*, 2007). However, this species has a very large distribution area and therefore tolerance to high temperature has probably to be considered at a population/strain level. Our domestic strains (Bouake and Manzala strains) have been shown to tolerate masculinizing treatments at 36°C. Survival rates of these strains were not affected by short (10 days) or long treatments (30 days) at 36°C (Baroiller *et al.*, 1995 ; Baroiller et D'Cotta, 2001 ; Baroiller *et al.*, 2009). Similar results have been reported on the same Manzala strain maintained in other laboratories/facilities (Rougeot *et al.*, 2008 ; Wessels *et al.*, 2011 ; Palaikostas *et al.*, 2013), with the exception of some rare progenies where both control and treated groups had lower survival rates. However, a strain or even a family effect cannot be excluded.

Interestingly, significantly low mortality rates (19% in the treated group *versus* 5% in the control) were reported by Pandit *et al.* (2015) in their Chitralada strain of Nile tilapia, following a very similar sterilizing treatment (37°C during 45-60 days beginning either at the fry or juvenile stages). In this strain, gonadal sex differentiation is not thermosensitive: treatment at 36°C on 10 dpf fry does not induce any masculinization. A first hypothesis might be that thermosensitive strains are considerably less tolerant to high temperatures (37°C) than non-sensitive ones. However, although our group has demonstrated the important variability of thermosensitivity between families, strains/populations (Bezault *et al.*, 2007; Baroiller *et al.*, 2009), we have never observed any correlation between thermosensitivity levels and mortalities. Moreover, in other thermosensitive species such as the pejerrey, strong temperatures can sterilize individuals under controlled conditions without any effect on survival. In addition, during hot summers partially sterile individuals can be collected in the wild (Ito *et al.*, 2008).

Another interesting hypothesis relies on feeding efficiency at high temperatures. As reported by Pandit *et al.* (2015 and pers. comm.) on the Chitralada strain, 37°C treatments

decreased feed intake and increased the rate of gastric evacuation in fish. Therefore, such treatments reduced the digestibility and assimilation of nutrients; especially during critical stages of fry development and consequently, low feed intake and feed efficiency can strongly impact fish growth and survival. For this reason Pandit *et al* (2015) used high-protein feed (Nakamura, pers. comm.) to compensate for the low feed intake and feed efficiency. In our last fry treatment (PY3) for 60 days, the use of feed with a high protein proportion beginning with 63% protein for 2 weeks followed by 56% protein content, significantly increased the survival rates (80%) to very similar levels to those reported by Pandit *et al.* (2015). Therefore, the energetic consequences of high temperature treatments should not be underestimated. This could probably explain the better survival rates we reported for juveniles (compared to fry) in our strains when using classic feed, and also the better survivals (35%) following a short (30 days) treatment compared to a longer one (60 days). Hence, we assume that the observed mortalities should be mainly related to nutritional aspects rather than lethal temperatures. Preliminary results of Baroiller and Clota (1998) reported that sterile gonads were observed following a 30-day masculinizing treatment at 36°C but at that time we did not check if the induced sterility was transient or permanent. Despite the fact that we have performed numerous and similar 36°C treatments in our facilities, we have never observed other sterile individuals in the treated groups during the sexing procedure.

The present study on males, as well as our parallel work on females (Almin *et al.*, submitted) and the two recent papers on tilapia (Nakamura *et al.*, 2015 ; Pandit *et al.*, 2015), all agree that in order to induce a complete and permanent sterilization in *O. niloticus* and *O. mossambicus*, the minimal duration for a 37°C treatment is 45-60 days.

When we consider the three phenotypes of affected gonads found in this study, consisting in translucent, string-like and partially sterile gonads, they represent together a much higher proportion in heat-treated juveniles (76.5%) than in fry (36%). When we compare the same 37°C treatment in Nile tilapia females a duration of 30 days affected more fish with 31.5% gonads showing translucent, string-like or partially sterile gonads, than what was seen in males. Likewise, the 60-day duration proved much more efficient in female fry with 87.5% than what was seen in male fry with only 36%. Conversely, in juveniles the 60 day treatment seemed more efficient in males with 76.5% compared to female juveniles where 59% of the gonads were affected. The variable thermal tolerance (germ cell capacity to survive to a 37°C temperature treatment) we observed in males in the current study was very

similar to the high variability of thermosensitivity (masculinizing effects of 36°C treatments) between individuals, progenies, strains/populations we reported previously (Baroiller *et al.*, 1995; Baroiller et D'Cotta, 2001 ; Bezault *et al.*, 2007 ; Baroiller *et al.*, 2009 ; Poonlaphdecha *et al.*, 2013). Such variability was not found when Mozambique tilapia of a mixed sex progeny was treated to 37°C (Nakamura *et al.*, 2015) where 100% of the individuals were affected, becoming totally sterile. One explanation could rely on the target of the 37°C treatment. In order to totally sterilize a gonad, the treatment should directly or indirectly induce the loss of germ cells but also germline stem cells. So a first question concerns the possible differential thermal-tolerance between these 2 cell types: does the variability in our strains rely on a higher thermal-tolerance of the germ cells or the germ stem cells (or both cell types)? If germ cells are more sensitive than the germline stem cells, then partially sterile gonads can be expected through the recolonization of at least part of the gonads.

Two other questions regarding the possible consequences of high temperature need to be considered: is the thermal-tolerance of the germ cells related to the thermosensitivity within a same progeny? Do the mechanisms of temperature-induced masculinization and sterilization have the same basis? Masculinization could rely on germ cell depletion and on the existence of a threshold number of germ cells determining the future sex of the gonads (a low number of germ cells resulting in a male differentiation).

In fish, absence of germ cells can lead to a testis differentiation in medaka and zebrafish (Kurokawa *et al.*, 2007 ; Siegfried and Nüsslein-Volhard, 2008 ; Slanchev *et al.*, 2005), but in goldfish or loach (Fujimoto *et al.*, 2010 ; Goto *et al.*, 2012) it does not affect ovary or testis development, and moreover, gene expression patterns in these sterile gonads are similar to those of fertile testes or ovaries. Conversely, combining our data and those from Pandit *et al.* (2015) and Nakamura *et al.* (2015) it is strongly suggested that in tilapia both ovarian and testis differentiation are perfectly possible in the absence of germ cells. Therefore, it would seem that the existence of a threshold, above which there is an ovarian development and below, a testis development does not seem to stand.

The lobular structure of tilapia testis is based upon different cystic units, each one resulting from a Sertoli cell whose cytoplasmic extensions surround a single spermatogonia. Successive proliferations of this single spermatogonia will produce a synchronously developing germ cell clone (Schulz *et al.*, 2005). During spermatogenesis diploid spermatogonia will proliferate through a mitotic phase and progressively differentiate into the spermatozoa through a meiotic (primary and secondary spermatocytes) and a spermiogenic

phases (haploid spermatids). We immunolocalized the Vasa protein in precocious stages of spermatogenesis, labelling spermatogonias A and B, and spermatocytes I in 27°C fry and juveniles as previously described (Kobayashi *et al.*, 2002 ; Pfennig *et al.*, 2012). In the Fry-37°C gonads, the absence of Vasa-staining in the TSL and STL portions of the partially sterile gonads confirmed germ cell depletion in the sterile regions. Conversely, vasa labelling was observed in the fertile areas of these Fry-37°C partially sterile gonads. Because the quantification of the global area stained with Vasa did not show significant differences between control and treated fish gonads, we assume that within the partially sterile gonads, possible compensative mechanisms with hyperproliferation of germ cells may occur in the fertile areas. Indeed such compensation associated with an increase in androgen secretion has been reported in the remaining testis of prepubertal rats after hemicastration (Brown and Chakraborty, 1991). Heat-treatments induced important depletion in the number of vasa-stained germ cells in sterile translucent juveniles, whereas intermediate reduction was observed in partially sterile individuals. These values were correlated with the decrease in *vasa* transcript levels.

The absence of apoptotic cells in the translucent gonads of treated juveniles probably reflects the delay between the end of the treatment and the sampling (2 months after treatment). All the germ cells have probably suffered apoptosis long before the sampling period. Conversely, the relatively important proportion of apoptotic cells observed in the partially sterile gonads (PS-37°C) of juveniles could be associated with long term effects of the treatment on the remaining germ cells in the fertile areas. In these areas we hypothesize that part of the remaining germ cells could degenerate. Considering that Sertoli cells can phagocyte residual bodies, residual sperm but also apoptotic germ cells (Schulz *et al.*, 2005), they could be involved in this clearance. In the TSL sterile gonads, despite the absence of spermatozoa in the lobular lumen, Sertoli cells secrete spermatid fluid as what has been found in teleosts following spermiation (Setchell, 1986). This suggests that Sertoli cells are still functional after the 37°C treatment.

The number of Sertoli and germ cells per cyst during spermatogenesis has been quantified in the Nile tilapia, showing that the amount of Sertoli cells was a critical parameter in the increase in testis size and magnitude of sperm production (Schulz *et al.*, 2005). We can speculate that conversely the depletion of germ cells with our heat-treatment would also affect the number of Sertoli cells inducing their decrease and then influence the reduction in testis size found in our study. We assessed the expression of the *amh* gene as a Sertoli marker and

although transcript levels do not totally reflect the cell number, the decrease displayed in *amh* transcript levels nevertheless suggests that the 37°C treatment also affected the Sertoli cells. It is possible that the temperature has a direct effect on Sertoli cells or alternatively that it is the decrease in germ cell number which influences the Sertoli cells. Sertoli cells are associated with a fixed number of germ cells, and thus their proliferation is related to spermatogonia mitosis (Schulz *et al.*, 2005). Likewise, based on our results, we assume that the reduction in germ cell number induced by the 37°C treatment might have caused a decrease in Sertoli cells and consequently this could explain the decrease in *amh* expression.

Alternatively, the decrease in *amh* expression might be important for the initiation of spermatogenesis like what has been previously described in eel (Miura *et al.*, 2002). Because *amh* quantification was performed in a pool of gonads, which included some partially sterile gonads, initiation of spermatogenesis could be stimulated by the decrease in *amh* expression in the fertile areas (37°C-PS).

Finally, it has been shown that Leydig cell proliferation mainly occurred during sexual maturation or testicular regression (Alvarenga and França, 2009). Consequently, the hyper proliferation of the Leydig cells that we observed at 37°C could be associated to the temperature induced regression of the testis. These results are coherent with the fact that steroid levels were not affected by a similar high temperature treatment in sterile Mozambique tilapia males who had typical male reproductive behavior (Nakamura *et al.*, 2015).

In conclusion, male gonads seem to have a higher thermal tolerance (germ cell capacity to survive to a 37°C temperature treatment) than females in our Manzala strain of Nile tilapia. It also appears that 37°C treatments have different effects on Sertoli and Leydig cells compared to germ cells. We speculate that heat treatments directly affect germ cells through apoptosis. Conversely, the two somatic cell types could be indirectly affected by the induced depletion of germ cells.

3. Résultats additionnels

Dans cette dernière partie, nous avons rajouté des résultats supplémentaires aidant à une meilleure compréhension de l'étude présentée précédemment.

Les juvéniles mâles XY élevés à la température normale de 27°C ont tous montré un stade avancé de la spermatogenèse (**Figure 48A**). Par contre, les mâles XY alevins ont présenté différents stades de spermatogenèse visibles dans la **Figure 48 A-C**. Contrairement à ce qui a été observé chez les groupes Juv-37°C provenant de deux descendance, seules des gonades partiellement stérilisées ont été trouvées chez les Fry-37°C. En s'appuyant sur la visualisation de la macroscopie des gonades, ce phénotype gonadique a pu être séparé en 3 sous-groupes :

- partiellement stériles (PS, **Figure 48E**) ;
- partiellement translucides (PTSL, **Figure 48D**) ;
- partiellement "string-like" (PSTL, **Figure 48F**).

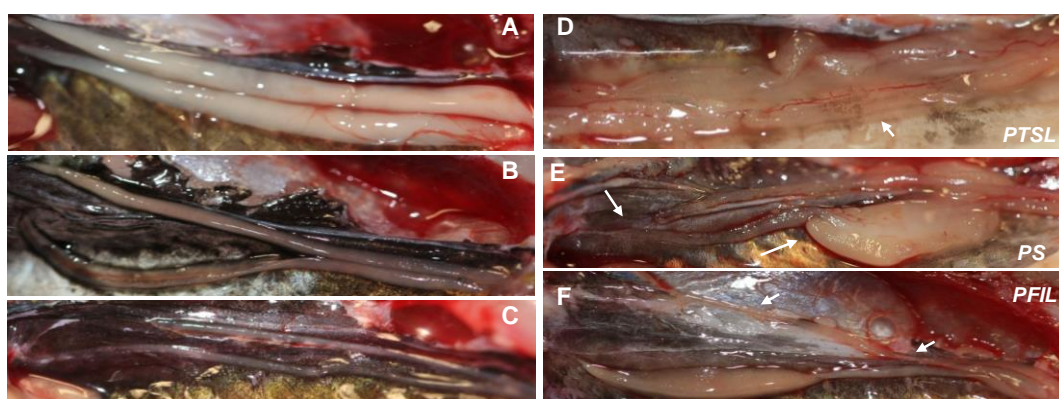


Figure 48. Macroscopie des gonades des mâles exposés à 37°C au stade alevin (10 dpf) pendant 60 jours, au moment du sexage 4 mois après l'arrêt du traitement. A-C : Male XY à la température normale de 27°C montrant différents stades de spermatogenèse. D-F : Différents types de stérilisation des gonades mâles XY traitées à 37°C : gonades partiellement translucides (PTSL), partiellement stérile (PS) et partiellement "string-like"(PSTL).

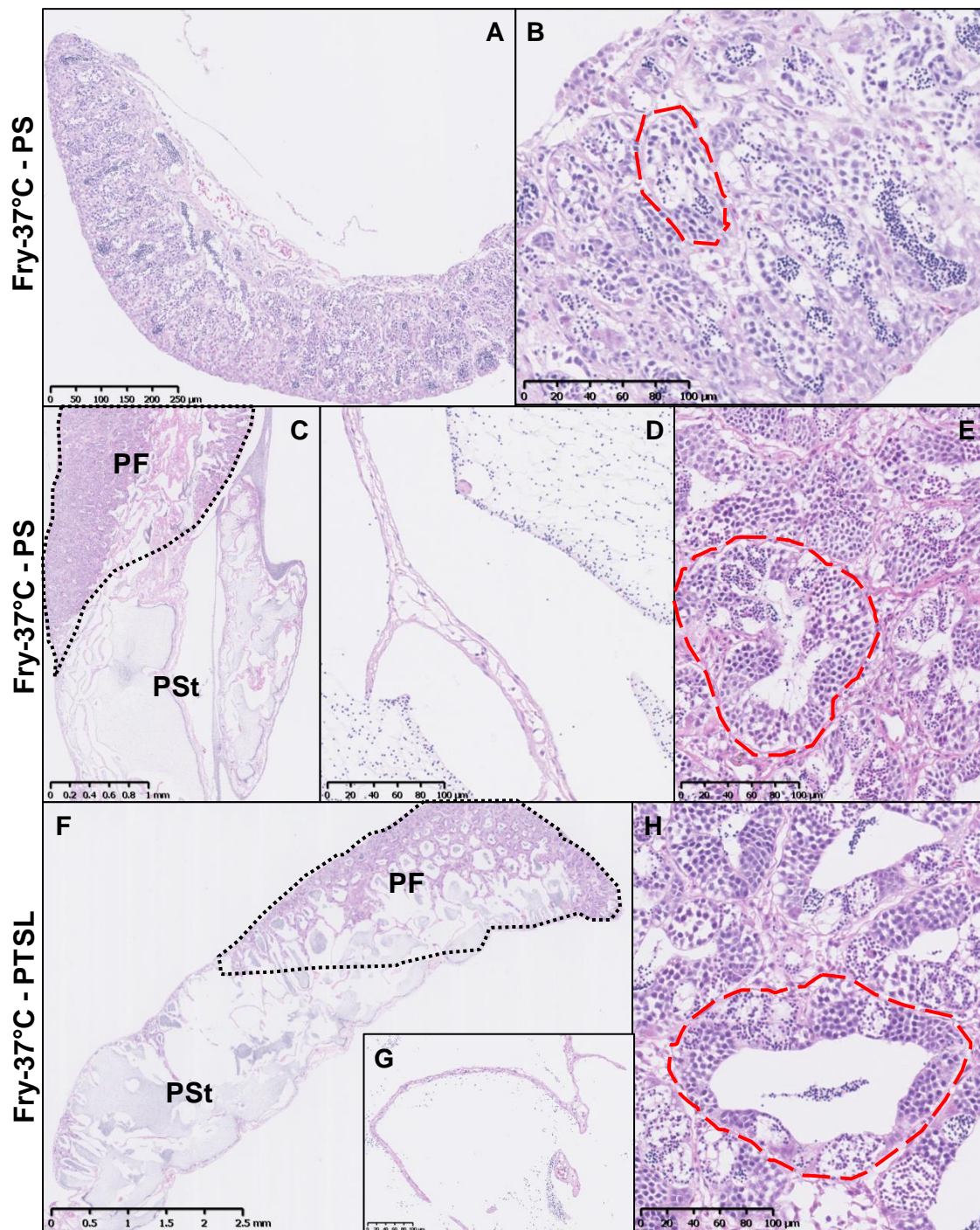


Figure 49. Histologie des gonades des mâles exposés à 37°C au stade alevin (Fry - 10 dpf) pendant 60 jours, au moment du sexage 4 mois après l'arrêt du traitement. A-B : Male XY à la température normale de 27°C montrant une spermatogenèse active. C-H : Structure cellulaire des types de stérilisation des gonades mâles XY traitées à 37°C : gonades partiellement stériles (PS, C-E), gonades partiellement translucides (PTSL, F-H). La ligne pointillée noire entoure la partie fertile (PF), l'autre partie dépourvue en cellules germinales est dite stérile (PSt). Dans les parties fertiles, de nombreux tubes séminifères sont visibles (ligne pointillée rouge).

**Chapitre 3: Effets d'un traitement par le busulan
sur la différenciation sexuelle et le développement
gonadique chez le tilapia du Nil, *Oreochromis
niloticus***

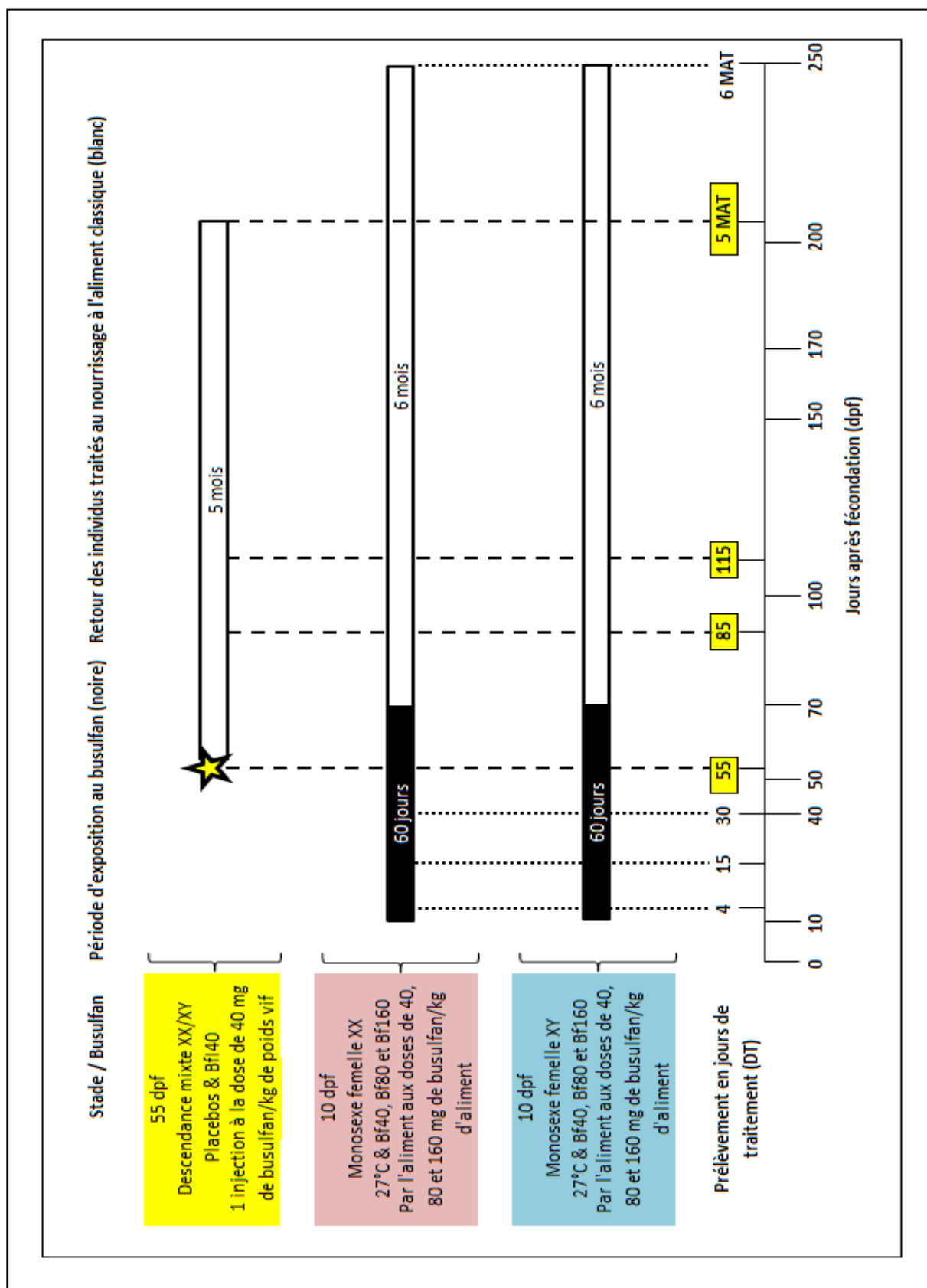


Figure 50. Diagramme schématisant les expérimentations busulfan par injection à une dose de 40 mg/kg de poids vif sur une descendance mixte (XX/XY), âgée de 55 dpf ou dans l'aliment, à différentes doses (40, 80 et 160 mg/kg d'aliment) chez des descendance monosexes femelles (XX) et monosexes mâles (XY) de tilapias du Nil âgées de 10 dpf.

1. Objectif de l'étude

Le busulfan, produit chimique utilisé dans le traitement des leucémies, est connu chez de nombreuses espèces de mammifères, reptiles, amphibiens et poissons pour éliminer, de façon transitoire, les cellules germinales des gonades tout en affectant également les cellules somatiques. Nous avons ainsi décidé d'utiliser l'induction de la stérilisation par le busulfan comme un possible témoin positif de nos expérimentations principales, à savoir l'induction de la stérilisation par les hautes températures de 37°C (**Figure 50**).

En s'appuyant sur les données de la littérature, nous avons lancé une première expérimentation par injection intra-péritonéale de busulfan. Des tilapias du Nil provenant d'une descendance mixte (XX/XY) de 55 dpf, pesant environ 2g ont été utilisés. Les individus ont été séparés en 2 groupes : le lot témoin a reçu seulement la solution d'injection (DMSO/Ringer) tandis que du busulfan était injecté dans la même solution pour le lot traité. Les 2 groupes ont été élevés à 27°C. L'injection intra-péritonéale a été faite à une dose de 40 mg de busulfan par kg de poids vif (**Tableau 7**). Malheureusement, le faible taux de survie des individus injectés au busulfan par rapport aux témoins n'ayant reçu qu'une injection de DMSO/Ringer nous a conduit à investiguer un autre type d'administration de cette molécule chez nos tilapias.

Chez de nombreuses espèces de poissons et en particulier chez le tilapia, les traitements par des hormones ou par des inhibiteurs d'enzyme de la stéroïdogenèse peuvent être réalisés en les incorporant à l'alimentation ; par contre aucune étude dans la littérature ne rapporte un tel type d'administration pour le busulfan. Nous avons donc lancé une deuxième série d'expérimentations en incorporant le busulfan à l'alimentation selon 3 doses différentes : 40, 80 et 160 mg de busulfan/kg d'aliment. Des alevins de 10 days post-fertilization (dpf) provenant de descendances monosexes femelles XX (produits à l'aide de néo-mâles XX) ou monosexes mâles XY (produits à partir de mâles YY) ont été utilisés. Pour chaque descendance, 2 lots d'effectifs identiques ont été constitués : le lot témoin recevait un aliment classique, tandis que le lot traité était nourri durant 60 jours avec un aliment dans lequel avait été incorporé le busulfan. Les 2 groupes, élevés à 27°C, ont été nourris *ad libitum* 3 fois par jour (**Tableau 7**).

L'analyse a été menée à trois niveaux (Figure 51) :

- A l'échelle macroscopique : étude de l'impact du traitement busulfan sur les sex-ratios et le phénotype gonadique des groupes d'individus traités, quelque soit le mode d'administration. Ces deux paramètres seront comparés avec les groupes contrôles à 27°C ayant reçu l'aliment classique.
- A l'échelle cellulaire : visualisation en histologie classique de la structure cellulaire des coupes à 4µm des gonades des individus traités au busulfan ; comparaison avec celle des individus contrôles.
- A l'échelle moléculaire : étude du profil d'expression de 3 gènes d'intérêt, marqueurs des cellules germinales (*vasa*) ou des cellules somatiques mâles (*amh* - *cellules de Sertoli*) et femelles (*cyp19a1a* - *cellules de la granulosa*). Ces deux derniers gènes sont respectivement impliqués dans la différenciation gonadique mâle ou femelle. Le profil d'expression des groupes traités au busulfan sera comparé à celui des groupes contrôles.

Descendance	Sexe génétique	Age	Dose de Busulfan (mg/kg)	Genre	Durée
OnB XX/XY-A	XXXY	55 dpf	40	Injection	1 injection à 55 dpf
OnB XX-S	XX	10 dpf	40	Aliment	2 mois
OnB XX-W	XX	10 dpf	80	Aliment	2 mois
OnM1 XY-G	XY	10 dpf	80	Aliment	2 mois
OnM1 XX-N	XX	10 dpf	160	Aliment	2 mois
OnM1 XY-O	XY	10 dpf	160	Aliment	2 mois

Tableau 7. Récapitulatif des différentes descendances traitées au busulfan et leur sexe génétique : mixte (XX/XY), monosex femelle (XX) ou monosex mâle (XY) ; le mode d'administration du busulfan et sa dose : par injection à 40 mg de busulfan/kg de poids vif ou incorporé dans l'aliment aux doses de 40, 80 et 160 mg de busulfan/kg d'aliment. Une injection unique a eu lieu à l'âge de 55 dpf chez la descendance XX/XY. L'aliment contenant le busulfan a été administré à des descendances monosexes femelles (XX) ou monosexes mâles (XY) à partir de l'âge de 10 dpf (stade alevin) pendant 2 mois (60 jours de traitement).

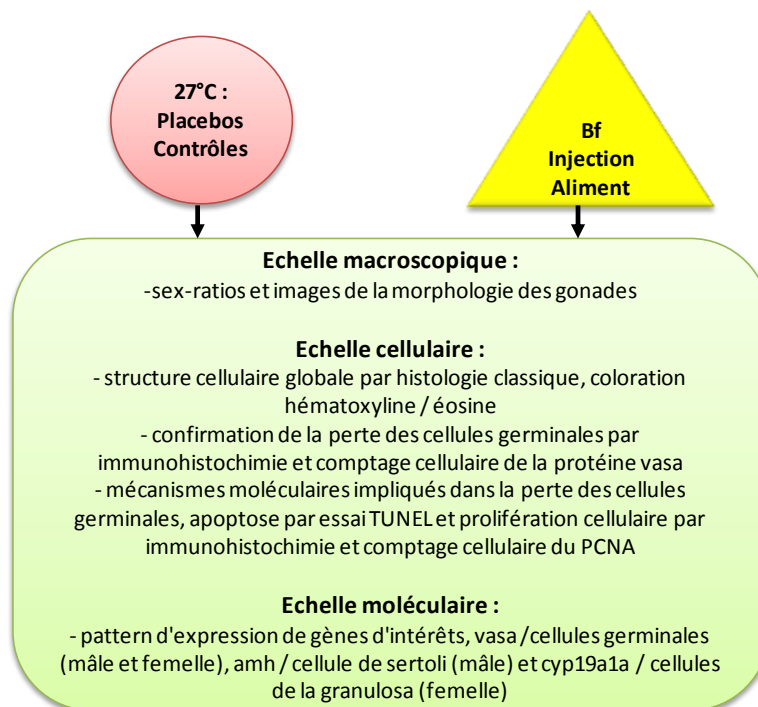


Figure 51. L'analyse comparative des groupes traités au busulfan (Bf), par injection intra-péritonéale ou incorporé dans l'aliment, avec les groupes 27°C, placebos ayant reçus uniquement l'injection de DMSO/Ringer ou témoins ayant reçus l'aliment classique, a été menée à trois niveaux. A l'échelle macroscopique (niveau 1), nous avons étudié l'impact du traitement au busulfan sur les sex-ratios et les phénotypes gonadiques des groupes d'individus traités. A l'échelle cellulaire (niveau 2), nous avons comparé la structure cellulaire des gonades de 4µm des individus traités avec celle des 27°C et nous avons aussi visualisé la présence des cellules germinales par immunohistochimie de la protéine vasa. A l'échelle moléculaire (niveau 3), nous avons étudié le profil d'expression de trois gènes marqueurs de types cellulaires : *vasa*, marqueurs des cellules germinales chez les mâles et femelles, *amh*, marqueur des cellules somatiques de Sertoli chez les mâles et *cyp19a1a*, marqueur des cellules somatiques de la granulosa chez les femelles.

2. Résultats et discussion des résultats

2.1. Expérimentation 1 : busulfan injecté en intra-péritonéal à une dose de 40 mg/kg de poids vif de poissons

Une descendance mixte de tilapias du Nil de la souche Bouaké, nommée OnB XX(XY ou YY)A, a été utilisée. Les poissons sont élevés à 27°C dans les circuits fermés du CIRAD et nourris *ad libitum*. A l'âge de 55 dpf et un poids d'environ 2g, les individus de cette descendance ont été séparés en 2 groupes: 1 lot contrôle qui a reçu une injection intra péritonéale de solution de DMSO/Ringer, appelé **Placebo (ou P)** (n = 100 individus) et 1 lot

traité qui a reçu une injection intra-péritonéale de busulfan à une dose de 40 mg de busulfan/kg de poids vif, appelé **BfI40** (n = 121 individus) (**Figure 52**).

Les poissons des 2 groupes ont été injectés à 55 dpf, puis après anesthésie et sacrifice des individus, des gonades et des cerveaux ont été prélevés 1 mois après l'injection (J29), 2 mois après l'injection (J60) et au moment du sexage, environ 8 mois après l'injection. Pour les dates de prélèvements J29 et J60, 5 individus ont été prélevés dans du Bouin et 11 individus dans du PFA 4%. Au moment du sexage, j'ai prélevé 3 individus dans du Bouin ou du PFA 4% et 10 individus dans de l'éthanol absolu ou du RNA later (**Tableau 8**).

OnBMXX(XYouYY)-A				Placebo DMSO (P)	Busulfan (Bf)
J0 (55 dpf) Début traitement	21/06/2011 1 injection	X		X	X
J29 - Prélèvement à 82 dpf (à 29 jours de J0) (1 mois après injection)	18/07/2011	Gonades (=G)	Bouin PFA 4%	n = 5 n = 11	n = 5 n = 11
		Cerveau (=B)	Bouin PFA 4%	n = 5 n = 11	n = 5 n = 11
J60 - Prélèvement à 113 dpf (à 60 jours de J0) (2 mois après l'injection)	18/08/2011	Gonades (=G)	Bouin PFA 4%	n = 5 n = 11	n = 5 n = 11
		Cerveau (=B)	Bouin PFA 4%	n = 5 n = 11	n = 5 n = 11
Prélèvement à ~8 mois Sexage des lots	20/12/2011	Gonades (=G)	Bouin	n = 3	n = 3
			PFA 4%	n = 3	n = 3
			Ethanol	n = 10	n = 10
			RNA later	n = 10	n = 10
		Cerveau (=B)	Bouin	n = 3	n = 3
			PFA 4%	n = 3	n = 3
			Ethanol	n = 10	n = 10
			RNA later	n = 10	n = 10

Tableau 8. Présentation des différentes dates de prélèvement des groupes d'individus Placebos et BfI40 de la descendance mixte OnB XX(XY ou YY)A. 3 prélèvements ont été effectués : les 2 premiers à 1 (J29) et 2 mois (J30) après l'injection et le dernier au moment du sexage, soit environ 8 mois après l'injection de busulfan. A chaque date de prélèvement, les gonades et les cerveaux ont été fixés dans du Bouin ou du PFA 4% pour les analyses histologiques, dans de l'éthanol absolu pour de futures analyses génomiques ou du RNA later pour les analyses expressionnelles.

2.1.1. Sex-ratio (SR ou phénotype gonadique), Index gonado-somatique (RGS) et survie

8 mois après l'injection, le sexage du groupe Placebo à 27°C provenant de la descendance mixte XX/XY a montré un sex-ratio biaisé vers le sexe femelle (2/3 de l'effectif - 31%), les mâles ne représentant qu'1/3 de l'effectif (69%) avec des gonades femelles mûres présentant

des œufs (ovaires) et des gonades mâles matures contenant du sperme (testicules). Le groupe traité BfI40 présente 77% de femelles (3/4 de l'effectif) et 23% de mâles (1/4 de l'effectif). Il n'y a pas de différence significative entre les moyennes de l'index gonado-somatiques (RGS) des femelles et des mâles injectés au busulfan par rapport aux femelles et mâles du groupe Placebo (**Tableau 9**).

En s'appuyant sur la loi de distribution mendélienne et nos résultats (2/3 à 3/4 de l'effectif sont des femelles et seulement 1/3 à 1/4 sont des mâles), nous pouvons affirmer que le père de la descendance est un mâle XY et non YY. En effet, dans le cas d'un mâle YY, nous aurions obtenu un sex-ratio équivalent entre femelles et mâles (50: 50).

Dans le groupe injecté à une dose de 40 mg de busulfan/kg de poids vif, seule une gonade semble être impactée par le traitement au busulfan laissant supposer que le busulfan n'a pas eu d'effets stérilisants sur la majorité des gonades des individus du groupe traité (**Tableau 9 et Figure 52**). Par contre, un sexage tardif, 8 mois après l'injection peut être à l'origine de ce résultat. En effet, il a été rapporté dans la littérature que l'effet du busulfan était très limité dans le temps ; il convient alors de vérifier si nous observons ce même résultat dans les gonades 30 et 60 jours après l'injection.

Par contre, le taux de survie des individus du groupe BfI40 est significativement plus bas (59%) que celui des individus du groupe Placebo (95%), ce qui révèle une grande toxicité du busulfan lorsqu'il est injecté en intra-péritonéal chez le tilapia.

Descendance	Traitement	Phénotype Gonadique (SR)	% SR	RGS	% survie fin manip
OnB XX/XY-A	Placebo à 27°C	Mâle	31	0,57 ± 0,09	95
		Femelle	69	5,39 ± 0,4	
	Bf I40 à 27°C	Mâle	23	0,90 ± 0,09	59**
		Femelle	77	5,62 ± 0,6	

Tableau 9. Récapitulatif des diverses données du sexage de la descendance mixte OnB XX/XY-A 8 mois après l'injection : 2 groupes Placebo et traité BfI40, phénotype gonadique ou sex-ratio ainsi que le pourcentage pour chacun des 2 groupes, le RGS de chaque phénotype gonadique et le pourcentage (%) de survie de chacun des groupes.



Figure 52. Lors du sexage, 8 mois après l'injection, 1 seul individu femelle avec une conformation atypique a été retrouvé dans le groupe BfI40. Ce phénotype gonadique a été classé comme une "gonade partiellement stérile" (PS).

2.1.2. Structure cellulaire

La structure cellulaire des gonades provenant du lot Placebo et du lot traité BfI40 a été analysée en histologie classique par coloration à l'hématoxyline - éosine. 2 gonades du lot Placebo et 2 gonades du lot BfI40 sont observées 1 mois (J30) et 2 mois (J60) après l'injection (J0 = 55 dpf).

Un très faible échantillonnage a été analysé en histologie, par conséquent je ferai seulement un descriptif des résultats obtenus. L'histologie classique par la coloration hématoxyline/éosine des coupes de gonades d'une épaisseur de 4µm nous a permis de visualiser la structure cellulaire gonadique. La comparaison des structures cellulaires n'a pas montré de différence entre les gonades mâles et femelles des individus Placebos et des individus injectés à la dose de 40 mg de busulfan/kg de poids vif, que ce soit 30 jours (85 dpf) ou 60 jours (115 dpf) après l'injection (**Figure 53**).

Les gonades des femelles Placebos à 115 dpf et injectées au busulfan à 85 dpf, soit 30 jours après l'injection, présentent un développement ovarien normal caractérisé par la présence d'ovocytes à différents stades : ovogonies (Oo), follicules pré-vitellogéniques (PVF) et vitellogéniques (VF), et des cellules folliculaires (CF). Les gonades des mâles Placebos et injectées au busulfan présentent un développement testiculaire normal avec la présence de cystes de spermatogonies, spermatocytes et spermatides, ainsi que de cellules somatiques de Sertoli et de Leydig et des canaux efférents.

Ces résultats suggèrent que l'injection de busulfan à une dose de 40 mg de busulfan/kg de poids vif n'a pas eu d'effet sur la structure cellulaire des ovaires et testicules des individus traités de la descendance mixte.

Série d'expérimentation 1 : Busulfan administré par injection intra-péritonéale

Descendance mixte XX/XY-A – Juvenile (55 dpf) – 1 injection

Histologie classique – coloration hématoxyline/éosine

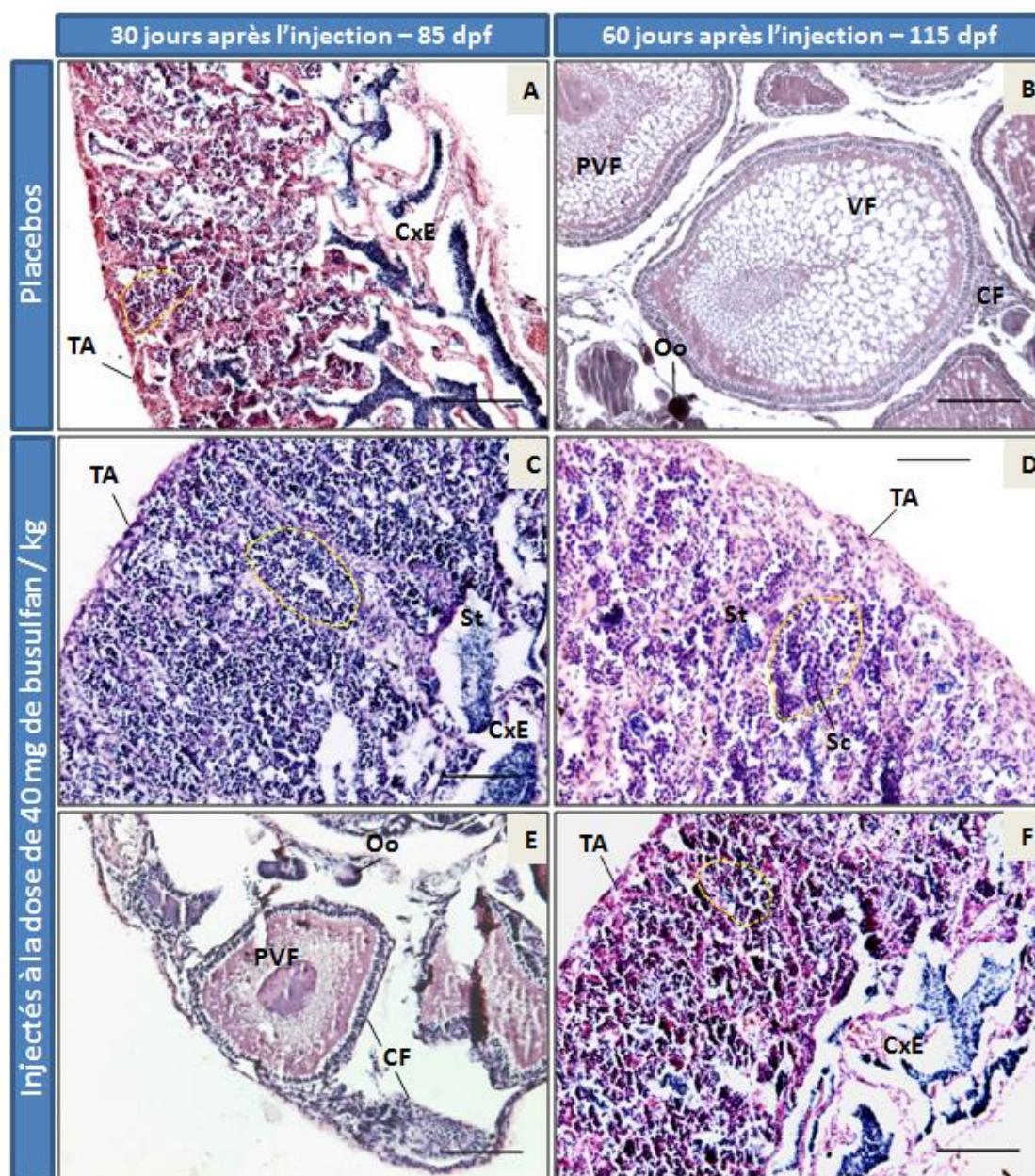


Figure 53. Structure cellulaire des gonades des individus Placebos et traités à 55 dpf par une injection intra-péritonéale de busulfan à la dose de 40 mg de busulfan/kg de poids vif. Coloration hématoxyline- éosine. (A) Coupe de gonade mâle Placebo 30 jours après l'injection à 85 dpf. B : Coupe de gonade femelle Placebo 60 jours après l'injection à 115 dpf. C-E : Coupes de gonades mâles injectées à la dose de 40 mg de busulfan / kg de poids vif, 30 jours après l'injection à 85 dpf (C) et 60 jours après l'injection à 115 dpf (D,F). (E) Coupe de gonade femelle traitée 30 jours après l'injection à 85 dpf. Les gonades des femelles Placebos et injectées au busulfan présentent un développement ovarien normal caractérisé par la présence d'ovocytes à différents stades: ovogonies (Oo), follicules pré-vitellogéniques (PVF) et vitellogéniques (VF), des cellules folliculaires (CF). Les gonades des mâles Placebos et injectés au busulfan présentent un développement testiculaire normal avec la présence de tubes séminifères (entourés en jaune) composés de cystes de spermatogonies, spermatocytes (Sc) et spermatides et des canaux efférents (CxE). La tunique albuginée (TA), enveloppe externe du testicule, est visible chez les mâles placebos et Bfl40.

2.2. Deuxième série d'expérimentation : busulfan dans l'aliment à des doses de 40, 80 et 160 mg/kg d'aliment

Cinq descendance monosexes femelles (XX) et monosexes mâles (XY) de tilapias du Nil de souche Bouaké ou Manzala ont été utilisées. Une seule descendance monosex femelle OnB XX-S a été traitée à la dose de 40 mg de busulfan/kg d'aliment, car aucun effet du traitement busulfan à cette dose n'était visible lors du sexage des individus du groupe Bf40. Deux descendance, une monosex femelle OnB XX-W et une monosex mâle OnM1 XY-G, ont été traitées à une dose de 80 mg de busulfan/kg d'aliment. Deux descendance, une monosex femelle OnM1 XX-N et une monosex mâle OnM1 XY-O, ont été traitées à une dose de 160 mg de busulfan/kg d'aliment (**Tableau 7**).

2.2.1. Sex-ratio (SR ou phénotype gonadique), Index gonado-somatique (RGS) et survie

Les sexages des 5 descendance ont eu lieu entre 2 et 5 mois après la fin du traitement. Le sexage des groupes contrôles a confirmé un sex-ratio de 95 à 100% de femelles chez les 3 descendance monosexes femelles et un sex-ratio de 100% de mâles chez les 2 descendance monosexes mâles (**Tableau 4**). Il en est de même chez les groupes traités au busulfan qui présentent un sex-ratio de 91 à 100% de femelles pour les descendance monosexes femelles et de 97 à 100% de mâles pour les descendance monosexes mâles (**Tableau 10**).

Il n'y a pas de différence significative entre les moyennes de l'index gonado-somatique (RGS) des groupes de femelles et mâles contrôles à 27°C, et les groupes de femelles et mâles ayant ingérés du busulfan aux différentes doses testées (**Tableau 10**).

Le taux de survie est élevé chez les groupes traités au busulfan et similaire à celui des groupes contrôles à 27°C, avec 97 à 99% de survie au moment des sexages de chacune des 5 descendance. La prise alimentaire du busulfan n'a donc pas eu d'effet sur le taux de survie des animaux traités.

Contrairement au mode d'administration du busulfan par injection intra-péritonéale, la prise alimentaire du busulfan, quelle que soit la dose testée, n'a pas eu d'impact sur le taux de survie des groupes traités. Et, que ce soit chez les descendance 100% femelles ou 100% mâles, quelle que soit la dose de busulfan incorporée (40, 80 et 160 mg/kg

d'aliment), le traitement au busulfan n'a pas eu d'impact que ce soit sur le sex-ratio ou sur l'index gonado-somatique de ces descendance.

Descendance	Traitement	Phenotype Gonadique (SR)	% SR	RGS	% survie fin manip
OnB XX-S	27°C	Femelle	95	1,90 ± 0,2	97
	Bf 40	Mâle	5	2,85 ± 0,1	98
		Femelle	100	2,18 ± 0,2	
OnB XX-W	27°C	Femelle	NC = 1 seul ind	NC	98
	Bf 80	Femelle	100	NC	99
OnM1 XY-G	27°C	Mâle	100	0,17 ± 0,03	95
	Bf 80	Mâle	100	NC	98
OnM1 XX-N	27°C	Femelle	Exp. XX juvénile 37°C	NC	96
	Bf 160	Femelle	91	1,71 ± 0,3	98
		Mâle	9	0,08 ± 0,02	
OnM1 XY-O	27°C	Mâle	100	0,20 ± 0,05	98
	Bf 160	Mâle	97	0,11 ± 0,02	98
		Femelle	3	0,20	

Tableau 10. Récapitulatif des diverses données du sexage des 5 descendance utilisées pour la série d'expérimentation 2, à savoir l'incorporation du busulfan dans l'aliment à 3 doses différentes : 40, 80 et 160 mg de busulfan/kg d'aliment. Chaque descendance a été divisée en 2 groupes : 27°C, le lot ayant reçu l'aliment classique et Bf suivi du chiffre de la dose de busulfan (40,80 ou 160) pour le lot ayant reçu le traitement durant 60 jours. Pour chacun des groupes, 27°C et Bf, les sex-ratios, RGS et pourcentages (%) de survie sont donnés.

2.2.2. Structure cellulaire

En raison d'un très faible échantillonnage analysé en histologie, je ferai seulement un descriptif des résultats obtenus. L'histologie classique, par la coloration hématoxyline/éosine des coupes de gonades d'une épaisseur de 4µm, nous a permis de visualiser la structure cellulaire gonadique. La comparaison des structures cellulaires n'a pas montré de différence entre les gonades des individus contrôles et des individus traités, quel que soit le sexe des individus traités (femelles ou mâles), la dose de busulfan employée (80 et 160 mg/kg) ou la date de prélèvement (à la fin du traitement à 60 JT ou bien 30 jours après la fin du traitement à 90 JT) (**Figure 54**).

Les gonades femelles contrôles et traitées à une dose de 80 mg de busulfan/kg d'aliment sont composées d'ovocytes à des différents stades: ovogonies (Oo), follicules au stade péri-nucléaire primaires et secondaires (PN1 et PN2) à l'âge de 70 dpf, à la fin du traitement de 60

jours (60 JT), ainsi que des cellules folliculaires (cellules de la granulosa) et de la thèque, représentatifs d'un développement ovarien normal (**Figure 54A et D**).

Les gonades mâles contrôles et traitées aux doses de busulfan de 80 mg/kg et 160 mg/kg sont constituées de cystes de spermatogonies, spermatocytes et spermatides, ainsi que de cellules somatiques de Sertoli et de Leydig, caractéristiques d'une spermatogenèse normale (**Figure 54B, C, E et F**).

Ces résultats suggèrent que, quelle que soit la dose du traitement utilisée (80 ou 160 mg de busulfan/kg d'aliment), le busulfan n'a pas eu d'effet sur la structure cellulaire des gonades des individus génétiquement femelles (XX) et génétiquement mâles (XY).

2.2.3. Y-a-t-il un impact du busulfan sur les cellules germinales des gonades de tilapias femelles et mâles ?

Un très faible échantillonnage ayant été analysé en immunohistochimie, je ferai seulement un descriptif des résultats obtenus. L'immunohistochimie Vasa des coupes de gonades d'une épaisseur de 4µm nous a permis de visualiser la présence des cellules germinales dans les gonades. Chez les femelles contrôles, la protéine vasa est présente au niveau du cytoplasme des ovogonies et ovocytes I, follicules péri-nucléaire 1 et 2. Chez les mâles, un signal intense de l'anticorps Vasa est observé au niveau des spermatogonies. Ce signal baisse d'intensité dans les spermatocytes et est absent au niveau des spermatides. La comparaison des gonades des individus contrôles et des individus traités a montré un marquage similaire des cellules positives à Vasa, quelque soit le sexe (chez les femelles ou les mâles), la dose de busulfan employée (80 et 160 mg/kg) et la date de prélèvement (à la fin du traitement à 60 JT ou bien 30 jours après la fin du traitement à 90 JT) (**Figure 55**).

Cette observation suggère que, quelle que soit la dose de traitement employée (80 ou 160 mg de busulfan/kg d'aliment), le busulfan n'a pas eu d'effet sur le nombre des cellules germinales contenues dans les gonades des individus génétiquement femelles (XX) et génétiquement mâles (XY).

Série d'expérimentation 2 : Busulfan administré dans l'aliment

Monosexes femelles (XX) et monosexes mâles (XY) – Alevins (10 dpf) – 60 jours de traitement (60 JT)

Histologie classique – coloration hématoxyline/éosine

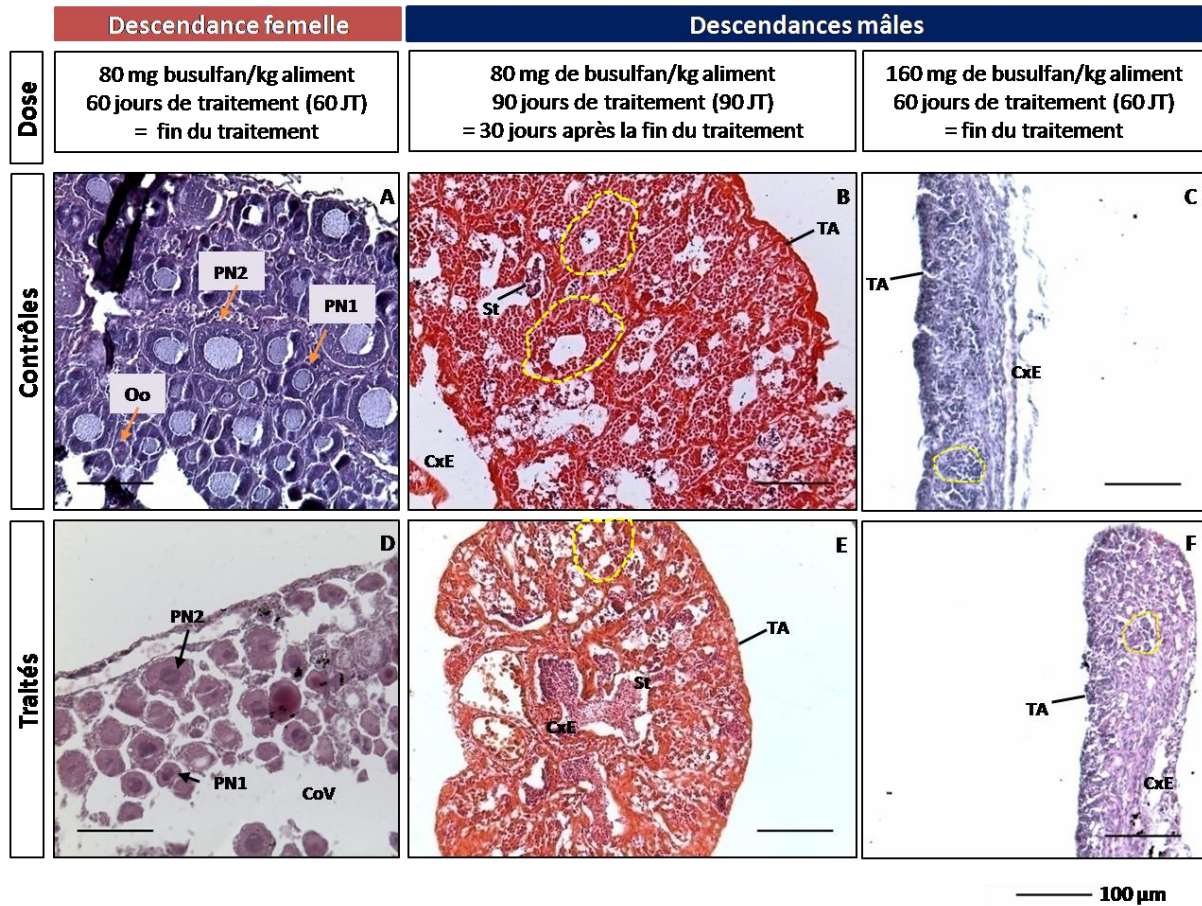


Figure 54. Structure cellulaire des gonades femelles et mâles contrôles à 27°C et traitées au busulfan. Coloration hématoxyline-éosine. (A) Coupe de gonades femelles contrôles à la fin des 60 jours de traitement. (D) Coupe de gonades femelles traitées à la dose de 80 mg de busulfan/kg d'aliment, à la fin des 60 jours de traitement (70 dpf). Les gonades des femelles contrôles et traitées présentent un développement ovarien normal par la présence d'ovocytes à différents stades : ovogonies (Oo), follicules péri-nucléaires primaires et secondaires (PN1 et PN2). (B) Coupe de gonades mâles contrôles 30 jours après la fin du traitement à 90 JT (100 dpf). (E) Coupe de gonades mâles traitées à la dose de 80 mg de busulfan/kg d'aliment 30 jours après la fin du traitement à 90 JT (100 dpf). (C) Coupe de gonades mâles contrôles, à la fin des 60 jours de traitement (70 dpf). (F) Coupe de gonades mâles traitées à la dose de 80 mg de busulfan/kg d'aliment, à la fin des 60 jours de traitement (70 dpf). Les gonades des mâles contrôles et traités présentent un développement testiculaire normal caractérisé par la présence de tubes séminifères (entourés en jaune) composés de cystes de spermatogonies, spermatocytes et spermatides et des canaux efférents (CxE). La tunique albuginée (TA), enveloppe externe du testicule, est visible chez les mâles contrôles, Bf80 et Bf160. JT, jours de traitement.

Série d'expérimentation 2 : Busulfan administré dans l'aliment

Monosexes femelles (XX) et monosexes mâles (XY) – Alevins (10 dpf) – 60 jours de traitement (60 JT)
Histologie classique – coloration hématoxyline/éosine

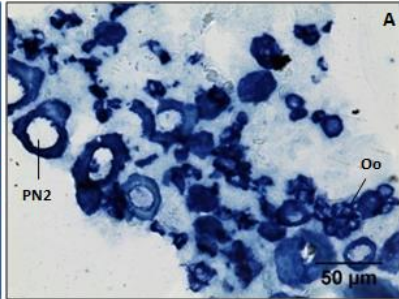
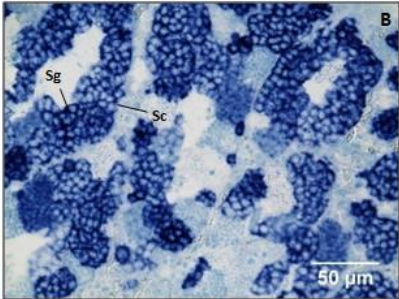
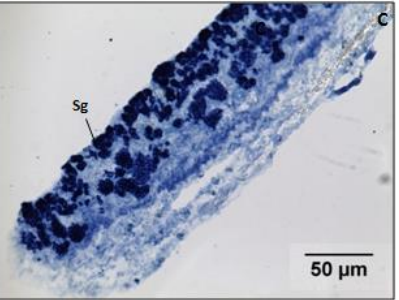
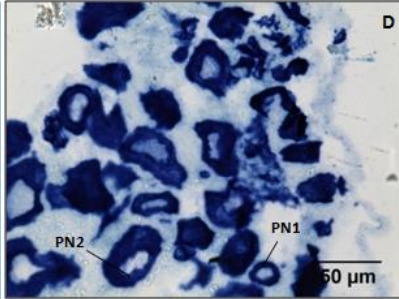
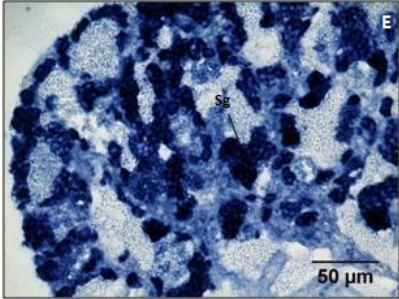
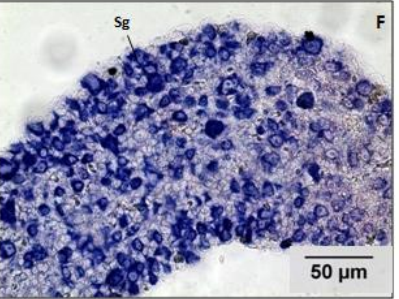
	Descendance femelle	Descendance mâle	
Dose	80 mg busulfan/kg aliment 60 jours de traitement (60 JT) = fin du traitement	80 mg de busulfan/kg aliment 90 jours de traitement (90 JT) = 30 jours après la fin du traitement	160 mg de busulfan/kg aliment 60 jours de traitement (60 JT) = fin du traitement
Contrôles			
Traités			

Figure 55. Visualisation de la localisation des cellules germinales dans les gonades femelles et mâles contrôles à 27°C et traitées au busulfan, par immunohistochimie de la protéine Vasa. (A) Coupe de gonades femelles contrôles à la fin des 60 jours de traitement (70 dpf). (D) Coupe de gonades femelles traitées à la dose de 80 mg de busulfan / kg d'aliment, à la fin des 60 jours de traitement (70 dpf). (B) Coupe de gonades mâles contrôles 30 jours après la fin du traitement à 90 JT (100 dpf). (E) Coupe de gonades mâles traitées à la dose de 80 mg de busulfan/kg d'aliment 30 jours après la fin du traitement à 90 JT (100 dpf). (C) Coupe de gonades mâles contrôles, à la fin des 60 jours de traitement (70 dpf). (F) Coupe de gonades mâles traitées à la dose de 80 mg de busulfan/kg d'aliment, à la fin des 60 jours de traitement (70 dpf). Les gonades des femelles contrôles et traitées présentent un marquage cytoplasmique de leurs ovogonies (oo) et follicules péri-nucléaires primaires et secondaires (PN1 et PN2). Les gonades des mâles contrôles et traités présentent un fort marquage au niveau de leurs cystes de spermatogonies (Sg) et de spermatocytes (Sc) et spermatides (St). Ce signal est très affaibli, voire inexistant dans les spermatides. JT, jours de traitement.

2.2.4. Au niveau moléculaire.

Les profils d'expression des gènes suivants ont été analysés par PCR en temps réel : *vasa*, marqueur des cellules germinales chez la femelle et le mâle, *amh* (hormone antimüllérienne) marqueur des cellules de Sertoli chez le mâle qui est impliqué dans la différenciation testiculaire, et *cyp19a1a* (aromatase gonadique) marqueur des cellules de la granulosa chez la femelle qui est impliqué dans la différenciation ovarienne.

Pour les 3 dernières descendance du Tableau 6 (OnM1 XX-N, OnM1 XY-G et OnM1 XY-O), les gonades ont été prélevées à différents temps du traitement pour suivre le profil

d'expression de ces 3 gènes d'intérêt : à 4 et/ou 7 jours de traitement (4 JT et/ou 7 JT), à 15 JT, à la moitié du traitement à 30 JT et à la fin du traitement à 60JT. Pour la dernière descendance mâle énumérée, le profil d'expression des 3 gènes a aussi été visualisé à 120 JT, soit 60 jours après la fin du traitement. Pour les dates de prélèvement 4, 7 et 15 JT, les troncs ont été prélevés et pour les dates 30, 60 et 120 JT les gonades ont été prélevées.

Profil d'expression du gène Vasa

Chez la descendance 100% femelle OnB XX-S, il n'y a pas de différence significative du taux des transcrits *vasa* entre le groupe contrôle et le groupe traité ayant été alimenté avec une dose de 40 mg de busulfan/kg d'aliment, au moment du sexage 5 mois après la fin du traitement. Ceci suggère que le traitement à la dose de 40 mg de busulfan/kg d'aliment n'a pas eu d'effet sur l'expression du gène *vasa*. En se basant sur la littérature et le fait que le busulfan ait un effet très limité dans le temps, nous pouvons penser qu'un sexage tardif, très éloigné de la fin du traitement, pourrait être responsable de cette observation, ou bien que la dose de 40 mg de busulfan/kg d'aliment est trop faible pour avoir un effet visible sur les gonades des poissons traités.

Chez la descendance 100% femelle OnM1 XX-N, malgré des différences visibles sur l'histogramme ci-après entre les taux des transcrits *vasa* chez le groupe contrôle par rapport au groupe traité Bf160 aux temps de prélèvement 4, 7, 15 et 60 jours de traitement (4 JT, 7 JT, 15 JT et 60 JT - **figure 56**), ces différences d'expression ne sont pas significatives. Ces résultats suggèrent que le traitement busulfan incorporé dans l'alimentation, même à une dose très forte de 160 mg de busulfan/kg d'aliment et à la fin du traitement de 60 jours (60 JT), n'a pas eu d'effet sur le profil d'expression du gène *vasa*, dans les gonades d'individus génétiquement femelles (XX).

Il en est de même chez les descendances 100% mâles. En effet, quelle que soit la dose utilisée (80 mg de busulfan/kg d'aliment pour la descendance OnM1 XY-G ou 160 mg de busulfan/kg d'aliment pour la descendance OnM1 XY-O), nous n'avons pas visualisé de différence significative du taux des transcrits *vasa* entre les groupes contrôles 27°C et les groupes traités Bf80 et Bf160, même au bout des 60 jours de traitement (60 JT).

Les résultats obtenus chez les femelles et les mâles suggèrent que, quelle que soit la dose utilisée (40, 80 ou 160 mg de busulfan/kg d'aliment), le busulfan n'a pas eu d'effet sur le profil d'expression du gène *vasa* dans les gonades des individus génétiquement femelles (XX) et génétiquement mâles (XY).

Le taux des transcrits *vasa* chez les groupes contrôles à 27°C et les groupes ayant ingérés le busulfan semble bien corrélé avec la présence de cellules germinales dans les gonades de ces individus.

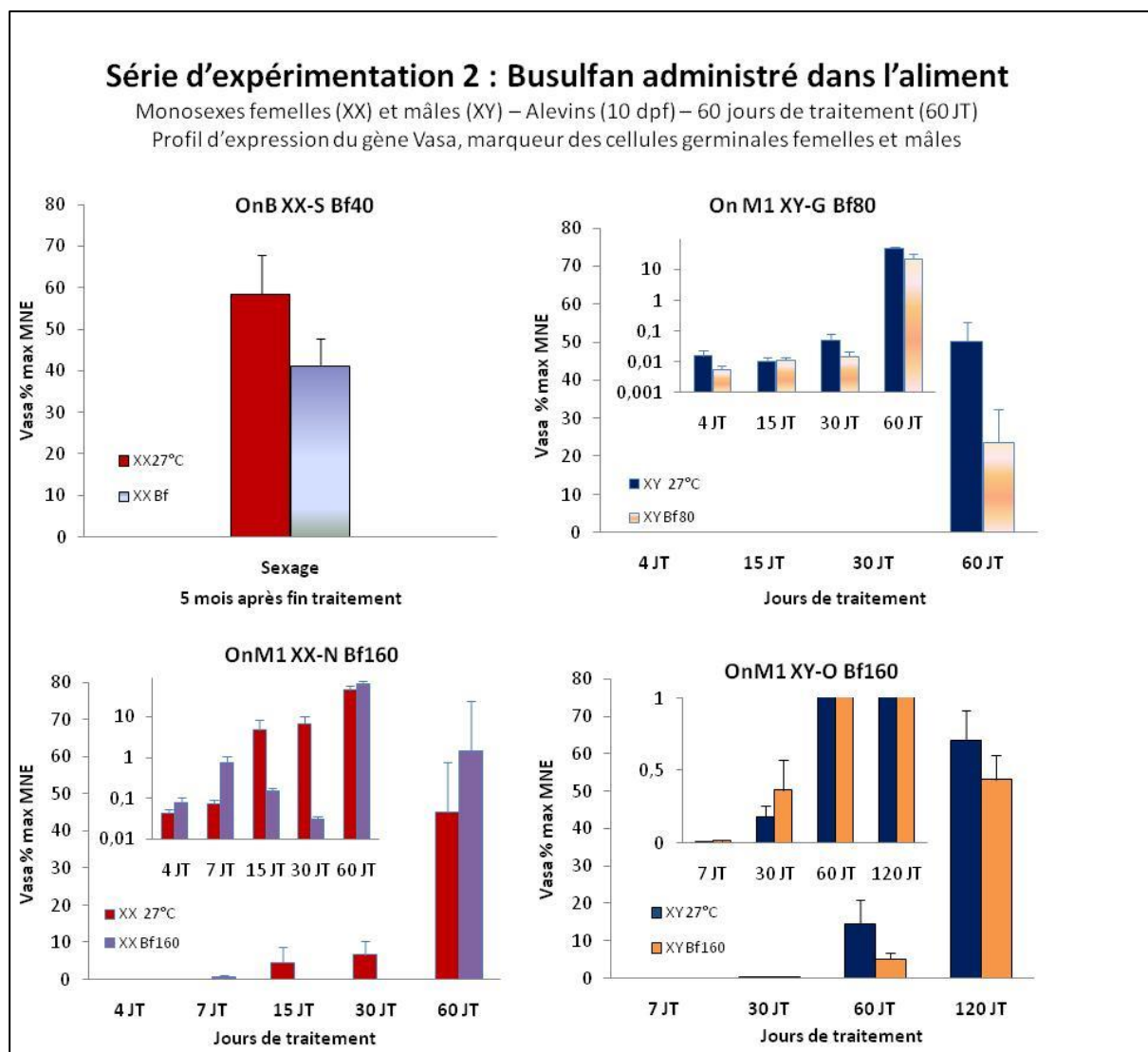


Figure 56. Histogrammes représentant le profil d'expression du gène *vasa* chez 4 descendance. 2 sont des descendance monosexes femelles, l'une traitée à 40 mg de busulfan/kg d'aliment (OnB XX-S) et l'autre à une dose de 160 mg/kg d'aliment (OnM1 XX-N). Pour chacune, les groupes de femelles contrôles sont représentés en rouge et les groupes de femelles traitées au busulfan en violet. Les 2 autres descendance sont monosexes mâles, l'une traitée à 80 mg de busulfan/kg d'aliment (OnM1 XY-G) et la seconde à 160 mg de busulfan/kg d'aliment (OnM1 XY-O). Pour chaque descendance, les groupes de mâles contrôles sont représentés en bleu et les groupes de mâles traités au busulfan en orange. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM. Pour les descendance OnM1 XY-G, OnM1 XY-O et OnM1 XX-N, chaque valeur représente $n = 4$ à 8 troncs ou gonades. MNE, Expression de Normalisation Moyenne ; JT, jours de traitement.

Profil d'expression du gène amh

Chez la descendance femelle OnM1 XX-N, nous avons visualisé des niveaux très bas des transcrits de l'*amh* chez les 2 groupes, contrôles à 27°C et traités à la dose de 160 mg de busulfan/kg d'aliment (XX Bf160 - **Figure 57**). Ces résultats sont en accord avec le fait que l'*amh* est exprimé au niveau des cellules somatiques de Sertoli chez le mâle et participe à la différenciation testiculaire.

Des niveaux bas d'expression de l'*amh* sont également observés de 4 jusqu'à 30 jours de traitement (4, 7, 15 et 30 JT), soit entre l'âge de 14 et 40 dpf, chez les groupes contrôles à 27°C ou traités au busulfan des descendance mâles OnM1 XY-G et OnM1 XY-O. Nous avons ensuite visualisé une augmentation progressive du taux des transcrits de l'*amh* à 60 jours de traitement (60 JT), à l'âge de 70 dpf chez les 2 descendance 100% mâles et à 120 jours (120 JT), soit 60 jours après la fin du traitement, à 130 dpf chez la descendance OnM1 XY-O. Malgré des différences visibles sur l'histogramme ci-dessous (**Figure 57**) entre les taux des transcrits *amh* chez les groupes contrôles par rapport aux groupes traités Bf160 aux temps de prélèvement 4, 7, 15, 60 et 120 jours de traitement (4 JT, 7 JT, 15 JT, 60 JT, 120 JT - **figure 57**), ces différences d'expression ne sont pas significatives. Ces résultats suggèrent que le traitement busulfan incorporé dans l'alimentation, même à une dose très forte de 160 mg de busulfan/kg d'aliment et à la fin du traitement de 60 jours (60 JT), n'a pas eu d'effet sur le profil d'expression du gène *amh* dans les gonades des mâles traités au busulfan.

Les résultats obtenus chez les mâles suggèrent que, quelle que soit la dose de traitement employée (80 ou 160 mg de busulfan/kg d'aliment), le busulfan n'a pas eu d'impact sur le profil d'expression du gène *amh* dans les gonades des individus génétiquement mâles (XY) ; ceci amène à penser que le busulfan n'a pas eu d'effet sur les cellules somatiques mâles de Sertoli.

Profil d'expression du gène cyp19a1a

Chez les descendance mâles OnM1 XY-G et OnM1 XY-O, nous avons visualisé des niveaux très bas des transcrits de *cyp19a1a*, à la fois chez les mâles témoins à 27°C, mais aussi chez les mâles traités au busulfan. Ces résultats sont en accord avec le fait que *cyp19a1a* est exprimé au niveau des cellules somatiques de la granulosa chez les femelles et participe à la différenciation ovarienne. Bien qu'une forte tendance de la baisse du taux des transcrits *cyp19a1a* puisse être observée à 4, 15 et 30 JT pour la descendance OnM1 XY-G (p-value respectivement de 0,07 ; 0,06 ; 0,052) et à 30 JT pour les OnM1 XY-O (p-value de 0,08) chez

les groupes Bf80 et Bf160, aucune différence significative ($p\text{-value} > 0,5$) n'est trouvée entre les groupes contrôles à 27°C et traités à la dose de 80 et 160 mg de busulfan/kg d'aliment (**Figure 58**).

Chez la descendance femelles OnM1 XX-N, malgré la baisse du pourcentage de transcrits *cyp19a1a* visibles sur l'histogramme ci-après (**Figure 58**) chez le groupe Bf160 aux temps de prélèvement 4, 7, 15 et 60 JT, une forte tendance est observée à 4 JT ($p\text{-value}$ de 0,06), mais ces différences d'expression ne sont pas significatives ($p\text{-value} > 0,05$). Ces résultats suggèrent que le traitement busulfan incorporé dans l'alimentation, à la dose la plus forte de 160 mg de busulfan/kg d'aliment), n'a pas eu d'effet sur le profil d'expression du gène *cyp19a1a*, dans les gonades des femelles traitées au busulfan.

Les résultats obtenus chez les femelles suggèrent que, même en employant la dose la plus forte de 160 mg de busulfan/kg d'aliment, le busulfan n'a pas provoqué d'inhibition du profil d'expression du gène *cyp19a1a* dans les gonades des individus génétiquement femelles (XX) ; cette observation laisse penser que le busulfan n'a pas eu d'impact sur les cellules somatiques femelles de la granulosa.

Série d'expérimentation 2 : Busulfan administré dans l'aliment

Monosexes femelles (XX) et mâles (XY) – Alevins (10 dpf) – 60 jours de traitement (60 JT)

Profil d'expression du gène *Amh*, marqueur des cellules de Sertoli chez le mâle

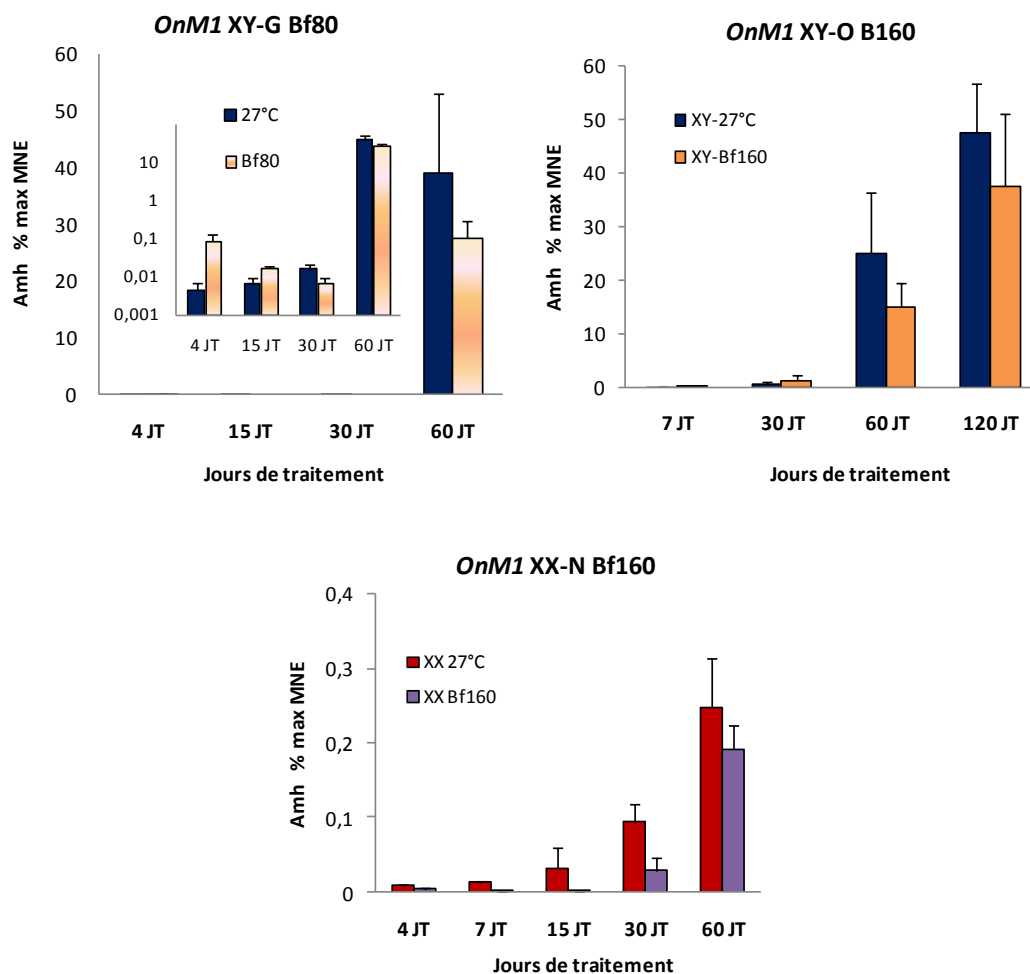


Figure 57. Histogrammes représentant le profil d'expression du gène *amh* chez 3 descendance. 1 est une descendance monosexue femelle traitée à une dose de 160 mg/kg d'aliment (OnM1 XX-N). Le groupe de femelles contrôles est représenté en rouge (XX 27°C) et le groupe de femelles traitées au busulfan en violet (XX Bf160). Les 2 autres descendance sont monosexes mâles, l'une traitée à 80 mg de busulfan/kg d'aliment (OnM1 XY-G) et la seconde à 160 mg de busulfan/kg d'aliment (OnM1 XY-O). Pour chaque descendance, les groupes de mâles contrôles sont représentés en bleu (XY 27°C) et les groupes de mâles traités au busulfan en orange (XY Bf80 et XY Bf160). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM. Pour les descendance OnM1 XY-G, OnM1 XY-O et OnM1 XX-N, chaque valeur représente n = 4 à 8 troncs ou gonades. MNE, Expression de Normalisation Moyenne ; JT, jours de traitement.

Série d'expérimentation 2 : Busulfan administré dans l'aliment

Monosexes femelles (XX) et mâles (XY) – Alevins (10 dpf) – 60 jours de traitement (60 JT)
 Profil d'expression du gène *Cyp19a1a* marqueur des cellules de la Granulosa chez la femelle

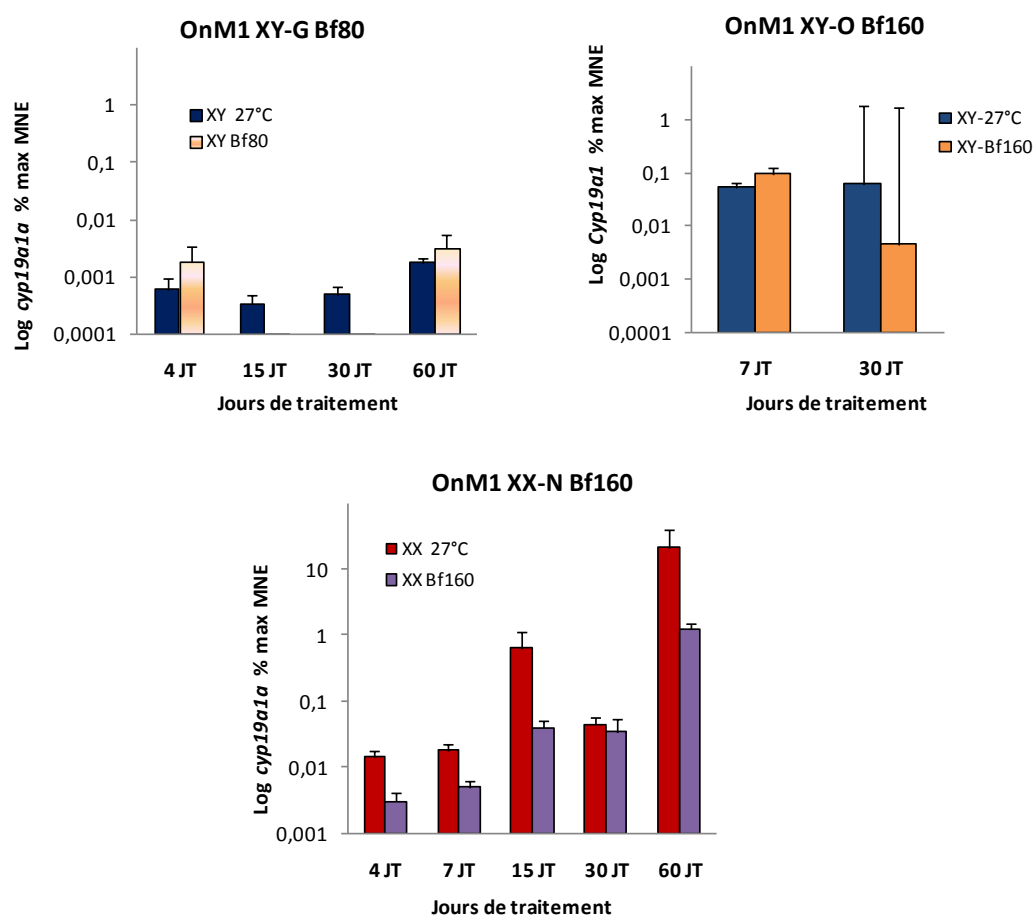


Figure 58. Histogrammes représentant le profil d'expression du gène *cyp19a1a* chez 3 descendance. 1 est une descendance monosex femelle traitée à une dose de 160 mg/kg d'aliment (OnM1 XX-N). Le groupe de femelles contrôles (XX 27°C) est représenté en rouge et le groupe de femelles traitées au busulfan en violet (XX Bf160). Les 2 autres descendance sont monosexes mâles, l'une traitée à 80 mg de busulfan/kg d'aliment (OnM1 XY-G) et la deuxième à 160 mg de busulfan/kg d'aliment (OnM1 XY-O). Pour chaque descendance, les groupes de mâles contrôles sont représentés en bleu (XY 27°C) et les groupes de mâles traités au busulfan en orange (XY Bf80 et XY Bf160). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM. Pour les descendance OnM1 XY-G, OnM1 XY-O et OnM1 XX-N, chaque valeur représente n = 4 à 8 troncs ou gonades. MNE, Expression de Normalisation Moyenne ; JT, jours de traitement.

Discussion Générale

L'objectif principal de cette thèse était d'étudier les effets d'une stérilisation induite par les hautes températures sur le développement gonadique des femelles et mâles chez une espèce de poisson tropical d'intérêt majeur en aquaculture, le tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus*. En particulier, il s'agissait de caractériser, par des approches cellulaires et immunologiques, certains des mécanismes impliqués dans cette stérilisation, notamment au niveau de la balance apoptose/prolifération cellulaire. Enfin, en utilisant des gènes marqueurs de types cellulaires, nous voulions déterminer si les effets du traitement sont seulement observés au niveau des cellules germinales ou s'ils touchent également certaines cellules somatiques des gonades mâles et/ou des gonades femelles.

Par ailleurs, afin de disposer de gonades dépourvues de cellules germinales, nous avons également testé deux modes d'administration (injection ou *via* l'alimentation) d'un agent alkylant connu pour sa forte cytotoxicité envers les cellules germinales, le busulfan.

La mise en évidence d'un effet masculinisant des fortes températures (36°C) appliquées à des stades précoces (10 dpf) chez le tilapia du Nil (Baroiller *et al.*, 1995), et d'une thermosensibilité variable selon les familles, ont conduit notre groupe à analyser un grand nombre de gonades ainsi traitées. L'utilisation de populations génétiquement monosexes femelles (issues de néomâles XX) avait alors permis de démontrer la masculinisation induite par les fortes températures, par comparaison des sex-ratios témoins (0% mâles) et traités (20-90% mâles). La masculinisation induite par le traitement était confirmée par le testage en descendance des mâles issus de ce traitement (production de descendance monosexes femelles), de même que la fonctionnalité des gonades de ces mâles XX ; de la même manière, les ovaires des individus traités mais non thermosensibles se sont révélés parfaitement fertiles comme démontré par la reproduction des femelles issues des traitements. Toutefois, quelques rares gonades stériles induites par ces traitements à 36°C avaient alors été rapportées (Baroiller et Clota, 1998). L'existence de ces rares individus stériles retrouvés uniquement dans certains lots traités suggérait que des températures supérieures à 36°C appliquées durant 30 jours à partir de 10 dpf pourraient induire de plus fortes proportions de gonades dépourvues de cellules germinales. Bien que la présence de populations sauvages du tilapia du Nil ait été rapportée dans des plans d'eaux où les températures naturelles atteignaient les 40°C (Trewavas, 1983 ; Bezault *et al.*, 2007 ; Nyingi *et al.*, 2009 ; Kavembe *et al.*, 2014), la plupart des autres populations sauvages sont rencontrées dans des régimes thermiques oscillant entre 28°C et 34°C. Il convenait donc d'abord de s'assurer que nos souches disponibles supportaient bien une température de 37°C.

Afin de définir les conditions optimales d'un traitement stérilisant par de fortes températures (niveau thermique, période et durée...), les premiers traitements à fortes températures ont été réalisés sur des alevins âgés de 10 jours post-fécondation (10 dpf) de la souche Manzala. En effet, à cet âge, la gonade ne contient qu'un nombre très limité (une quarantaine) de cellules germinales considérées comme peu différenciées (Baroiller, 1988 ; D'Cotta *et al.*, 2001). Il apparaissait donc pertinent d'appliquer le traitement thermique avant la multiplication et la différenciation de celles-ci.

Nos résultats ont montré qu'un traitement à 37°C pendant 60 jours était nécessaire pour affecter la fertilité des gonades. Ces données confirment celles obtenues par Pandit *et al.* (2015) et Nakamura *et al.* (2015) qui concluent qu'un traitement à 37°C permet de stériliser les gonades de 2 espèces de tilapia, s'il est respectivement appliqué durant 45-60 jours chez *O. niloticus* ou pendant 50 jours chez *O. mossambicus*.

Utilisation de populations monosexes

Chez le tilapia du Nil, le déterminisme du sexe repose en grande partie sur une homogamétie femelle (femelle XX et mâle XY). Chez les poissons, et en particulier chez le tilapia, sous réserve d'effectuer un traitement précoce, il est possible d'inverser le sexe de manière fonctionnelle et de produire des mâles XX ou des femelles XY. Les mâles XX croisés par des femelles classiques XX produisent ensuite des descendances composées uniquement de femelles XX (descendance monosexue femelle). Les femelles XY croisées par des mâles XY permettent l'obtention de mâles YY. Ces mâles YY, viables et fertiles, produisent des descendances monosexes mâles XY. Ces descendances monosexes femelles ou mâles constituent un outil précieux pour répondre à la deuxième question de cette thèse : **les cellules germinales sont-elles plus sensibles au traitement par de très fortes températures dans des gonades femelles ou mâles, et par conséquent le traitement impacte-t-il de manière similaire les cellules germinales des deux sexes ou préférentiellement celles de l'un des deux sexes ?** De fait, nous ne disposons de mâles YY que chez la souche Manzala qui a donc été majoritairement utilisée pour cette étude réalisée sur descendances monosexes.

Des différences populationnelles existent en matière de tolérance aux très fortes températures

Comparée à la souche Chiltralada utilisée par les collègues japonais, les souches Bouaké et Manzala ont révélé une moindre tolérance à la température de 37°C. En effet, quel que soit le

sexe et le stade auquel est appliqué le traitement, la survie des groupes traités à 37°C est très significativement plus faible que celle des individus contrôles élevés à 27°C. Cette mortalité induite, est même supérieure chez des alevins traités.

En première analyse, les différences de mortalité constatées entre les deux souches utilisées par nos collègues japonais et nous-même, suggèrent qu'il existe des différences populationnelles qu'il conviendrait de mieux étudier à la fois dans une optique appliquée (production d'animaux stériles en aquaculture), mais aussi pour identifier et conserver les populations plus fragiles dans un contexte de changement climatique.

Quelle que soit la souche utilisée, il reste cependant encore à améliorer les conditions d'élevage des tilapias du Nil pendant le traitement afin d'avoir un meilleur taux de survie chez les groupes 37°C. En particulier, des travaux récents chez cette espèce (Pandit et Nakamura, 2010) montrent que même si certaines populations sauvages peuvent tolérer des régimes thermiques naturels jusqu'à 40-42°C (Philippart et Ruwet, 1982), des températures de 37°C peuvent induire une diminution de la prise alimentaire et une augmentation du taux d'évacuation gastrique, se traduisant alors par une moins bonne croissance, et des mortalités plus importantes. Dans ces conditions, il importe alors de nourrir les animaux traités avec un aliment beaucoup plus riche en protéines pour compenser la prise alimentaire réduite et l'augmentation du taux d'évacuation gastrique, et leur apporter l'énergie nécessaire à un métabolisme accéléré. Faute de temps, nous avons testé l'effet d'une telle alimentation sur une seule descendance d'alevins (PY3) traitée pendant 60 jours à partir de 10 dpf : comparée aux autres descendances nourries avec un aliment classique, ce régime à haute teneur énergétique a permis d'obtenir 80% de survie (contre 93% chez le témoin). Ce bon résultat, similaire aux survies rapportées par Pandit *et al.* (2015) reste cependant à valider sur d'autres descendances. Parallèlement, de nouvelles études pourraient permettre d'optimiser les montées en température (en passant éventuellement par des plateaux) ainsi que la durée minimale d'exposition journalière pour assurer à la fois une bonne survie à court terme, mais aussi une dégénérescence gonadique totale et pérenne.

En matière de survie, les femelles semblent davantage impactées par ce traitement. En effet, les sex-ratios déterminés par macroscopie lors des sexages ont montré une proportion plus élevée de gonades stériles de phénotype gonadique "string-like" (STL) ou "translucides" (TSL) chez les femelles traitées. L'immunomarquage du marqueur de cellules germinales vasa conforte cette observation, un nombre plus faible de cellules germinales ayant été visualisé dans les gonades XX-37°C comparé aux XY-37°C. Ce résultat est en soit un atout pour la

production du tilapia en aquaculture car le but premier de ce traitement écologique serait d'éviter la reproduction en bassin des descendances mixtes. Par contre il ne résoudrait pas le problème des individus mâles fertiles échappés dans le milieu naturel.

Pourquoi avoir voulu travailler avec des juvéniles ?

Nous nous sommes donc posé la question suivante : cette fragilité des cellules germinales à la température de 37°C n'a-t-elle lieu qu'à des stades précoces (où elles sont peu nombreuses et peu différenciées), avant la différenciation sexuelle chez les alevins de 10 dpf, ou bien existe-t-elle également plus tardivement (quand elles sont en grand nombre, et déjà spécialisées), lors de la maturation sexuelle chez les juvéniles de 110 dpf ? Le groupe de Y. Nagahama a récemment mis en évidence la possibilité d'induire une réversion sexuelle par modulation des niveaux d'expression d'aromatase ou des niveaux d'œstrogènes chez des adultes tilapias. Cette persistance d'une sensibilité des cellules germinales à des facteurs exogènes chez des gonades adultes, nous a conduit à tester l'hypothèse que des traitements exogènes pouvaient aussi conduire à une stérilité à des stades matures ou pré-matures. Les analyses macroscopiques et histologiques nous ont permis de confirmer que la température a également eu un impact sur le développement gonadique des juvéniles de tilapias en stérilisant partiellement ou totalement une partie des individus traités à 37°C. Cependant, ce traitement semble moins efficace chez les juvéniles (29% versus 75 à 85% de gonades stériles STL et TSL chez les alevins pour le sexe femelle).

Par ailleurs, l'utilisation des juvéniles permet de résoudre en partie le problème de la petite taille des gonades dans les traitements réalisés chez les alevins. En effet, la faible quantité de matériel biologique disponible pour des gonades d'alevins conduit à attendre plusieurs mois (4 à 6) après la fin des traitements pour effectuer les prélèvements histologiques et les sexages. Un tel délai peut conduire à une recolonisation des gonades soit à partir de cellules germinales qui n'ont pas été affectées par le traitement, soit à partir de cellules souches. Dans ce cas, on peut alors sous-estimer la proportion d'individus affectés à court terme par le traitement.

Discussion des résultats d'induction de la stérilité par la haute température de 37°C

Plusieurs phénotypes gonadiques ont été générés.

Les analyses macroscopiques lors des sexages des descendance 100% femelle ou 100% mâle nous ont permis d'observer 5 phénotypes gonadiques différents chez les alevins et juvéniles traités à 37°C. Nous avons ainsi mis en évidence que la température de 37°C a eu des impacts d'intensité différente sur le développement gonadique des animaux traités. Les deux catégories gonadiques présentant les plus forts impacts du traitement sont les "string-like" (STL ou filiforme), rencontrées uniquement chez les femelles et les "translucides" (TSL) qui ne contiennent ni œufs chez les femelles (XX-37°C) ni sperme chez les mâles (XY-37°C). Ces types gonadiques sont très caractéristiques, les "STL" sont de l'épaisseur d'un cheveu et les "TSL" sont transparentes, de diamètre plus importants et remplies de liquide incolore et sont classées comme "stériles" (notés SG-STL et SG-TSL dans les articles). La température de 37°C a eu un effet moindre sur la morphologie des ovaires et des testicules partiellement stériles (37°C-PSG). Ces gonades présentent des régions contenant des ou du sperme et des zones "STL" et "TSL". Chez les alevins mâles, ces gonades PSG ont été divisées en 3 sous-catégories : "partiellement stérile" (PS), "partiellement string-like" (PSTL) et "partiellement translucide" (PTSL). Les gonades de la catégorie "ovaires" trouvées uniquement chez les XX-37°C ne sont pas touchées par le traitement. En ce qui concerne celles de la catégorie "testicules", nous ne pouvons pas affirmer que le traitement de 37°C ait pu engendrer la masculinisation de ces gonades chez les XX-37°C. En effet, des mâles XX spontanés sont parfois observés dans des descendance non traitées de néomâles XX (Baroiller et D'Cotta, 2001 ; Baroiller *et al.*, 2009a) ; ils résultent généralement de facteurs génétiques mineurs apportés par les deux parents. Dans le milieu naturel, de probables mâles XX ont identifiés par le sex-ratio de leur descendance ; là également, des mâles XX spontanés ont été observés dans leur descendance (Bezault *et al.*, 2007 ; Baroiller *et al.*, 2009). A température masculinisante (>32°C), un phénotype femelle est susceptible d'être masculinisé de manière fonctionnelle ; il est donc actuellement impossible de différencier un mâle XX spontané résultant de l'effet de facteurs génétiques mineurs, d'un « thermo-néomâle » résultant des effets masculinisants des fortes températures. Concernant les gonades des individus XY-37°C elles n'apparaissent pas touchées par le traitement.

Lors d'une masculinisation induite par la température, des descendance provenant de différents parents et les individus au sein d'une même descendance peuvent réagir différemment. En effet, la thermosensibilité d'une descendance dépend de facteurs génétiques

apportés par les 2 parents ; si on change l'un des 2 parents pour produire une nouvelle descendance, la thermosensibilité de celle-ci pourra être très différente de la précédente. De la même manière, une température masculinisante de 36°C donne très rarement 100% de mâles ; cela signifie qu'au sein d'une même descendance, certains individus XX seront masculinisés par le traitement, alors que d'autres individus XX sœurs ne le seront pas (Baroiller et D'Cotta, 2001 ; Baroiller *et al.*, 2009a). Nous avons observé la même tendance pour la stérilisation. Contrairement aux résultats de Pandit *et al.* (2015) et de Nakamura *et al.* (2015) qui observent une stérilisation de tous les individus des 2 sexes (100%), nous avons observé un effet allant de 0 à 100% de stérilité chez nos individus mâles et femelles traités à 37°C. Cette variation peut s'expliquer par des mécanismes de résistance ou d'adaptation plus importants chez certains animaux que chez d'autres (i.e. combinaisons alléliques favorables) ou bien par des différences précoces d'environnement génique. En effet, des travaux précédents (D'Cotta *et al.*, 2001) ont démontré que la thermosensibilité d'une descendance était corrélée au niveau d'expression du gène de l'aromatase à 27°C. En d'autres termes, les descendances très thermosensibles présentaient un plus faible niveau d'expression basal du gène de l'aromatase à 27°C que des descendances moins thermosensibles à des stades précoces (18 dpf). Or généralement chez les poissons, de faibles et forts niveaux d'expression du gène de l'aromatase à des stades précoces conduisent respectivement à une différenciation mâle ou au contraire femelle (Baroiller et D'Cotta, 2001 ; Baroiller *et al.*, 2009a) ; par ailleurs, chez les espèces de poissons thermosensibles, les fortes températures masculinisantes inhibent le niveau d'expression du gène de l'aromatase aux mêmes étapes précoces (D'Cotta *et al.*, 2001). L'ensemble de ces données suggère qu'il existe un seuil d'expression de l'aromatase, ou de niveau d'œstradiol dans les gonades, au dessus duquel un individu devient femelle et en dessous duquel il devient mâle. Dès lors, une température masculinisante (36°C) sera d'autant plus efficace que le niveau basal (à 27°C) d'expression de l'aromatase sera déjà faible. Enfin, à cette même période précoce (18 dpf chez le tilapia), apparait également un dimorphisme dans le nombre de cellules germinales : les individus avec peu de cellules germinales à ce stade deviendront des mâles et ceux où elles prolifèrent rapidement seront les futures femelles. Cette concordance entre l'évolution dimorphique des niveaux d'expression du gène de l'aromatase à 27°C et du nombre de cellules germinales ont conduit certains auteurs à imaginer que la masculinisation par les fortes températures pourrait passer par une diminution induite du nombre de cellules germinales avec, là aussi, un seuil en dessous duquel une différenciation testiculaire est induite (Baroiller *et al.*, 2009a). De la même manière, on peut

imaginer que d'autres différences d'environnement génique dans les gonades ou dans les cellules germinales rendent celles-ci plus ou moins sensibles selon les individus d'une même famille ou de différentes familles/populations. Cette différence de résultats avec ceux des équipes japonaises amène à se poser des questions biologiques et d'application pour l'aquaculture. Ceci pourrait venir d'un traitement différent, mais ce n'est pas le cas ici, ou être lié aux différentes souches utilisées, Manzala et Bouaké dans mon étude et Chitralada pour les japonais. Dans ce cas, ce constat suggérerait que les résultats des japonais ne seraient pas généralisables à toutes les souches de tilapias.

Chez les femelles et mâles juvéniles traités à 37°C, les RGS inférieurs à ceux des groupes contrôles à 27°C laissent supposer que le traitement a eu des effets inhibiteurs sur le développement gonadique, dont il conviendrait d'analyser ultérieurement la fertilité.

Induction de la perte des cellules germinales chez les 2 sexes

Chez les femelles tilapias du Nil, notre travail confirme les résultats de Pandit *et al.* (2015). Nos analyses histologiques ont en effet montré que la morphologie ovarienne devient désorganisée avec une déplétion totale des cellules germinales femelles, visualisée par immunomarquage de la protéine Vasa, dans les gonades femelles d'alevins traités à 37°C de types "string-like" et "translucides". Par conséquent, ces deux catégories gonadiques sont considérées comme stériles. Comme cette équipe l'a décrit, ces gonades contiennent des lamelles ovigères, une cavité ovarienne, et des cellules somatiques productrices de stéroïdes. Ce dernier type cellulaire est identifié par sa conformation histologique (grosses cellules ovoïdes avec présence d'un gros noyau et d'un cytoplasme abondant).

L'histologie des gonades stériles juvéniles femelles traitées à 37°C a montré une organisation cellulaire différente de celle observée chez les alevins. En effet, les gonades STL ou TSL trouvées chez les femelles juvéniles montrent aussi une désorganisation cellulaire ovarienne, sans aucune cellule germinale visible par immunomarquage de Vasa. Mais elles présentent de larges zones acellulaires, contenant du liquide, séparées par du tissu conjonctif, des vides de forme circulaire et de tailles variées suggérant l'ex-emplacement de follicules atrétiques et des agrégats phagocytaires synonymes d'une dégénérescence gonadique. Ceci démontre un effet stérilisant des températures de 37°C dans ces types gonadiques. Ces résultats sont en accord avec ceux montrés chez des femelles adultes pejerreys exposées aux fortes températures (Ito *et al.*, 2008). Il a été rapporté une dégénérescence gonadique avec l'arrêt du développement du nucleus chromatinien en ovocytes péri-nucléaires et des ovocytes péri-nucléaires en ovocytes

alvéolaires corticaux, suivi par l'atrésie et la résorption de ces ovocytes. Ce processus a eu pour conséquence une hypertrophie des lamelles ovigères, amenant au rétrécissement de l'épaisseur de l'ovaire visible en macroscopie et l'augmentation de l'activité phagocytaire. Dans nos analyses, la phagocytose est caractérisée par la formation d'agrégats de couleur jaunâtre renfermant de nombreuses cellules en dégénérescence chez les ovaires traités stériles de tilapia du Nil. Ce processus est impliqué dans la résorption des cellules germinales endommagées ou anormales et même des cellules somatiques dans les gonades femelles traitées chez le pejerrey. Ce phénomène est observé à des stades avancés de la dégénérescence gonadique chez les femelles adultes exposées aux fortes températures (Ito *et al.*, 2008), suggérant que le traitement 37°C a également bien induit la stérilisation des gonades STL et TSL des femelles juvéniles chez le tilapia du Nil.

Chez les mâles tilapias du Nil, les testicules des mâles contrôles (XY-27°C) d'alevins et juvéniles sont composés de cystes de spermatogonies, spermatocytes et spermatides ainsi que de cellules somatiques de Sertoli et de Leydig, caractéristiques d'une spermatogenèse normale. Par contre nous avons également mis en évidence une désorganisation cellulaire testiculaire chez de nombreux mâles traités (XY-37°C) lors des sexages à 4 MAT pour les alevins et à 2 MAT pour les juvéniles. En effet, chez les alevins mâles traités à 37°C, les gonades PS et PTSL sont composées de deux régions bien distinctes histologiquement d'après leur structure cellulaire. La première zone dite "fertile" présente une structure testiculaire normale caractéristique et identique à celles des mâles témoins XY-27°C, avec de nombreux cystes spermatogoniaux, spermatocytes et spermatides. Et la deuxième zone dite "stérile" est complètement déstructurée, contenant très peu, voire pas de cellules germinales mâles. A la différence, les gonades PFIL ont une structure histologique très comparable à celle des XY-27°C.

Chez les juvéniles mâles traités à 37°C, les gonades stériles TSL (translucides) n'ont pas de structure claire ; elles sont entourées de tissus conjonctifs et présentent peu ou pas de cellules germinales (immunomarquage de Vasa). Cependant ces testicules stériles présentent une grande quantité de liquide séminal dans les canaux efférents et des cellules épithéliales et des cellules somatiques de type Leydig sont visibles dans les interstices, comme rapporté par Nakamura *et al.* (2015). Ils contiennent aussi beaucoup de macrophages, signe d'une dégénérescence cellulaire et tissulaire. Les testicules partiellement stériles (PSG) présentent une structure cellulaire similaire à celle des gonades des mâles XY-27°C.

Chez *O. niloticus* de la souche Manzala, les cellules germinales seraient donc plus sensibles que les cellules somatiques chez les deux sexes. Ce résultat conforte les observations déjà faites chez d'autres espèces de poissons avec un déterminisme sexuel dépendant de la température (Strüssmann *et al.*, 1998 ; Pandit *et al.*, 2015).

Caractérisation de certains mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la diminution et/ou la disparition des cellules germinales ou résultants de la stérilisation induite par les fortes températures.

Chez le tilapia du Nil, il a déjà été mis en évidence qu'un traitement par une température de 37°C pendant 45 à 60 jours conduisait à une stérilisation des gonades des alevins et juvéniles femelles par déplétion des gonades en cellules germinales (Pandit *et al.*, 2015). Par contre, les mécanismes mis en jeu dans la disparition des CGs ne sont pas encore connus chez cette espèce. Ce travail a permis d'identifier certains des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la disparition des cellules germinales chez le tilapia du Nil ou étant la conséquence d'une stérilisation induite par la température de 37°C.

La balance apoptose/prolifération cellulaire

L'induction de la stérilité par les fortes températures a été observée chez plusieurs espèces de vertébrés; par contre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la perte des cellules germinales sont encore mal connus, en particulier chez les poissons. L'apoptose semble avoir un rôle clé dans la reproduction des téléostéens femelles, notamment pour la sélection et le recrutement des follicules ovariens du stade primordial au stade vitellogénique, mais aussi pour leur bon développement (Thomé *et al.*, 2012). Cependant, une augmentation inhabituelle du taux d'apoptose pourrait être à l'origine de la disparition des cellules germinales chez deux espèces de poissons. En effet, l'apoptose semble être l'un des mécanismes induits par des températures stérilisantes, ayant pour conséquence la déplétion des gonades en cellules germinales chez le pejerrey (Ito *et al.*, 2003). Chez le zebrafish, la mutation pour le gène *fancl* (lignée mutante *fancl*, Rodriguez-Mari *et al.*, 2010) engendre une réversion sexuelle des femelles XX en mâles phénotypiques, également *via* l'augmentation du taux d'apoptose des ovocytes avant leur entrée en méiose ; cette apoptose est contrôlée par la voie de signalisation Tp53 (Rodriguez-Mari *et al.*, 2010).

Comme déjà démontré chez le zebrafish (Rodriguez-Mari *et al.*, 2010) et le pejerrey (Ito *et al.*, 2003), nous avons également identifié par essai TUNEL que l'apoptose des cellules

germinales est impliquée dans la diminution ou la perte de celles-ci chez les juvéniles femelles de tilapias du Nil à la fin du traitement (60 DT) et 2 mois après la fin de celui-ci (2 MAT) et chez les mâles juvéniles à 2 MAT. Par contre, nos résultats ne semblent pas montrer de différences du taux d'apoptose entre les groupes contrôles à 27°C et traités à 37°C chez les alevins femelles et mâles. Mais un prélèvement tardif cinq à six mois après la fin du traitement, peut être l'une des causes de la non détection de l'augmentation de cellules apoptotiques chez les groupes d'alevins traités. Pour valider cette hypothèse, il conviendrait de vérifier le taux d'apoptose à la fin du traitement et de le comparer entre les groupes traités à 37°C et les contrôles à 27°C.

Un autre mécanisme pouvant être à l'origine de cette perte en cellules germinales serait une inhibition de la prolifération cellulaire. Le PCNA (Proliferating Nuclear Antigen) est souvent utilisé comme marqueur des cellules en prolifération, puisqu'il est présent au niveau des cellules mitotiques. Cette protéine est visualisée par immunohistochimie dans les follicules en croissance (Korfsmeier, 2002) et les cellules de la thèque des follicules atrétiques (Santos *et al.*, 2009) chez les femelles, au niveau des noyaux. Dans notre étude, la baisse significative de la prolifération cellulaire dans les gonades des alevins femelles traités à 37°C est confirmée par immunomarquage de la protéine PCNA et sa quantification.

Nous avons également confirmé qu'une stérilité induite par la haute température de 37°C engendrait la perte des cellules germinales dans les gonades des femelles traitées par baisse, voire même arrêt, de la prolifération cellulaire. Chez les alevins mâles, comme décrit par Pfenning *et al.* (2012), nous observons un grand nombre de spermatogonies A et B (SPG) et quelques cellules de Sertoli positives au PCNA dans les gonades mâles des contrôles XY-27°C. Ce signal est nucléaire (fort marquage marron), il révèle une activité mitotique intense, et par conséquent, une importante prolifération cellulaire. Dans les gonades mâle PS et PTSL traitées à 37°C, une activité mitotique intense (fort marquage marron), similaire à celle trouvée chez les XY-27°C, est visible dans les « parties fertiles », au niveau des spermatogonies et des cellules de Sertoli. Par contre il y a très peu de prolifération cellulaire dans les parties translucides ou filamenteuses de ces gonades traitées. Nous ne notons pas de différence significative du pourcentage de marquage PCNA entre les gonades des mâles XY contrôles (27°C) et traités à 37°C. La quantification du PCNA nous a confirmé ce qui a été dit précédemment. Même si certaines régions des gonades traitées à 37°C présentent une stérilité par l'absence de cellules germinales, les gonades de ces individus ne sont que

partiellement stérilisées, et conservent leur faculté de prolifération cellulaire et probablement une fonctionnalité dans les zones où les CGs persistent.

Modulation de l'expression de gènes spécifiques marqueurs de types cellulaires germinaux et somatiques par les hautes températures

Nous avons ciblé ce travail sur les cellules germinales et sur les cellules somatiques participant au bon déroulement de la gamétogenèse en utilisant des marqueurs spécifiques de ces types cellulaires. Les gènes suivants ont été sélectionnés : *vasa*/marqueur des cellules germinales, *cyp19a1a*/marqueur des cellules de la granulosa (femelle) et *amh*/marqueur des cellules de Sertoli (mâle). Chez la femelle, l'aromatase gonadique ou *cyp19a1a* est un marqueur des cellules de la granulosa impliquées dans le développement ovarien. Ce gène code pour une enzyme, le cytochrome P450arom, lequel assure la conversion des androgènes en œstrogènes et permet notamment la production de l'œstradiol-17 β ou E2. Chez le mâle, l'*amh* est un marqueur des cellules de Sertoli impliqué dans le développement testiculaire.

Nous avons démontré l'impact du traitement 37°C sur les cellules germinales et somatiques chez les 2 sexes à travers l'analyse expressionnelle des gènes marqueurs choisis. Ceci nous donne des informations sur certains des mécanismes induits lors d'une stérilisation par les hautes températures.

En effet, nous avons montré qu'il est possible d'impacter négativement l'expression de *vasa* avec un traitement de 60 jours à 37°C, même à un stade de développement avancé pendant la maturation sexuelle (110 dpf) des juvéniles mâles ou femelles de tilapias du Nil. Ces résultats suggèrent que la baisse d'expression du gène *vasa* dans ces gonades traitées est corrélée à une diminution du nombre de cellules germinales. Cependant, nous ne pouvons pas affirmer si la haute température a impacté directement les cellules germinales ou indirectement, en affectant d'abord les cellules somatiques. La diminution du nombre de cellules germinales ne serait alors qu'une conséquence de cette perturbation/disparition des cellules somatiques.

Nous avons également trouvé que le traitement à 37°C inhibe l'expression du gène *cyp19a1a* chez les juvéniles XX-37°C traités pendant 60 jours, mais aussi à 2 MAT. Une forte répression du gène de l'*amh* chez les juvéniles XY-37°C à la fin du traitement par une température de 37°C est également visible. Le même profil d'expression étant retrouvé deux mois après la fin du traitement, il n'y a donc pas eu renouvellement des cellules de Sertoli. Ces constats suggèrent que le traitement à 37°C a également eu un impact sur les cellules somatiques de la granulosa chez les femelles et de Sertoli chez les mâles. Cependant, nous ne pouvons pas indiquer si cet effet a directement impacté ces cellules somatiques ou

indirectement, à travers un effet sur les cellules germinales dans un premier temps, engendrant ensuite un effet négatif sur le maintien ou le développement de ces cellules somatiques dans les gonades des individus juvéniles traités à 37°C.

Par contre, l'observation de la modulation d'expression de nos gènes spécifiques de types cellulaires gonadiques ne nous permet pas de conclure si cette variation d'expression est un mécanisme à l'origine de la modification de la structure cellulaire. Cette variation peut être simplement la conséquence de la stérilisation induite chez les individus traités. Dans ce cas, ce mécanisme se trouve en bas de la cascade et d'autres mécanismes se situent en amont. Les interactions cellules germinales - cellules somatiques sont très importantes pour la mise en place du développement gonadique et une bonne gamétogenèse. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'en "cassant" un type cellulaire, l'autre type cellulaire n'ayant plus d'interactions avec celui-ci va moduler son expression lors d'une stérilisation induite par les hautes températures.

Discussion des résultats de l'expérience 3 : induction de la stérilité par un produit chimique le busulfan

L'induction de la stérilité par des traitements chimiques est une approche très étudiée en laboratoire. Le busulfan, agent alkylant utilisé en chimio-thérapie, est souvent employé. Cette molécule a deux utilisations. La plus connue est la déplétion des cellules germinales dans les gonades afin d'étudier le rôle de ce type cellulaire dans le développement gonadique de diverses espèces de vertébrés (mammifères, reptiles, amphibiens, poissons). Plus récemment, la déplétion des cellules germinales dans les gonades utilisée pour une nouvelle technique de transplantation de cellules germinales chez des individus déficients en cellules germinales (nombre ou qualité) pour restaurer leur fertilité (Brinster *et al.*, 2002 ; Takeuchi *et al.*, 2003 ; Lacerda *et al.*, 2006).

Afin de visualiser une potentielle réversion sexuelle, de nombreuses d'études réalisées chez divers vertébrés (souris, amphibiens, reptiles) ont observé le développement des gonades après déplétion des cellules germinales (CG) (DiNapoli et Capel, 2007 ; Choi *et al.*, 2009 ; Piprek *et al.*, 2012). Le mode d'administration en injection intra-péritonéale du busulfan est la méthode la plus souvent employée pour éliminer les CGs des gonades. Lors de cette étude, la dose de busulfan a été déterminée à partir d'un travail réalisé chez la souris (Choi *et al.*, 2009). Nous avons procédé à une unique injection intra-péritonéale de busulfan à une dose de

40 mg/kg de poids corporel sur des tilapias du Nil de 55 dpf provenant d'une descendance mixte (XX/XY) et pesant environ 2g. Malheureusement, la forte toxicité de cette dose de busulfan a engendré une importante mortalité chez le groupe traité moins de 12h après l'injection. Et nous n'avons pas visualisé d'impact de ce traitement sur la structure cellulaire des gonades de nos animaux traités contrairement à l'effet rapporté dans de nombreuses études (DiNapoli et Capel, 2007 ; Choi *et al.*, 2009 ; Piprek *et al.*, 2012). Il importe ici de préciser que ces études ont été menées sur des vertébrés (mammifères, amphibiens et reptiles) dont la physiologie est très différente de celle de notre modèle de poisson téléostéen.

Pour étudier la spermatogenèse et la biologie des cellules souches, la technique de transplantation des cellules germinales (TCG) a été largement utilisée au cours de la dernière décennie chez les mammifères (Brinster *et al.*, 2002). Un grand intérêt pour cette technique n'est apparu que récemment sur les animaux aquatiques tels les poissons (Takeuchi *et al.*, 2003 ; Lacerda *et al.*, 2006).

En 2006, Lacerda *et al.* ont standardisé cette technique sur des mâles adultes de tilapias du Nil sexuellement matures. La déplétion de la spermatogenèse endogène nécessite la combinaison de deux injections de busulfan de 18 mg/kg de poids corporel et 15 mg/kg de poids corporel, à deux semaines d'intervalle, en association avec une température de 35°C. Elle est visible dès 3 semaines après la première injection. La morphologie et le volume des cellules de Leydig ne sont pas affectés par ce traitement et un faible taux de mortalité est observé. Plus récemment, Majhi *et al.* (2009) ont examiné la pertinence du traitement busulfan sur une autre espèce de poisson, le pejerrey *Odontesthes hatcheri*. La haute température seule (25°C) induit une dégénérescence naissante de la gonade et une perte des cellules germinales. Mais l'effet le plus marqué est observé en combinant cette température de 25°C avec une double administration de 40 mg/kg de busulfan.

Il semblerait que chez les espèces de poissons à déterminisme sexuel dépendant de la température (TSD) comme le tilapia du Nil et le pejerrey, une action seule du busulfan ne suffit pas à éliminer les cellules germinales des gonades. Par contre, la combinaison du busulfan, avec un seuil de température très élevée supportée par ces deux espèces est nécessaire pour obtenir un effet maximal du traitement sur la perte des cellules germinales dans les gonades. Il s'avère également nécessaire de procéder à 2 injections à environ deux semaines d'intervalle et non à une injection unique au début de l'expérimentation. Contrairement à nos expérimentations et même s'ils ont procédé à deux injections et non pas une, Lacerda *et al.* (2006) ont injecté des doses de busulfan deux fois moins élevées que la

notre (15 à 18 mg/kg *versus* 40 mg/kg) et ont combiné le busulfan à la température de 35°C. Ceci peut expliquer une faible mortalité des poissons traités dans leur étude ainsi qu'un effet de leur traitement sur l'élimination des cellules germinales.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à un nouveau mode d'administration du busulfan chez le tilapia du Nil. De nombreuses études rapportent l'effet d'androgènes ou d'œstrogènes sur le développement gonadique d'espèces de poissons en incorporant ces hormones à l'aliment. Ce dernier est alors distribué pendant la période critique de différenciation sexuelle de ces espèces (Guerrero, 1988 ; Baroiller et Jalabert, 1989 ; Vera Cruz et Mair, 1994 ; Mélard *et al.*, 1995 ; Baroiller et Toguyeni, 1996 ; Guiguen *et al.*, 1999 ; Kwon *et al.*, 2000 ; D'Cotta *et al.*, 2001a ; Desprez *et al.*, 2003 ; McAllister et Kime 2003 ; Fenske et Segner, 2004). A notre connaissance, aucune donnée dans la littérature ne relate aujourd'hui l'administration du busulfan dans l'aliment comme méthode d'ingestion chez les individus traités que ce soit chez des espèces de mammifères, reptiles, amphibiens ou encore chez des poissons téléostéens. Par conséquent, 3 doses croissantes de 40, 80 et 160 mg de busulfan/kg d'aliment ont été administrées pendant 2 mois à des alevins âgés de 10 dpf, afin de visualiser les effets de ces traitements sur le développement gonadique des poissons traités chez les 2 sexes.

Nous savons que le busulfan a une action courte dans le temps ; chez des souris mâles ayant reçu une seule injection de 40 mg de busulfan/kg de poids corporel, il a été démontré que le busulfan provoquait une augmentation significative du pourcentage de cellules apoptotiques et dépendante du temps de traitement (Choi *et al.*, 2009). En effet, une augmentation des cellules positives au TUNEL est observée une semaine après l'injection. Elle est à son maximum 2 semaines après l'injection. Ensuite l'apoptose cellulaire revient au même niveau que celle des individus contrôles au bout de quatre semaines. Par conséquent, nous avons analysé les coupes des gonades traitées juste à la fin du traitement de 2 mois, sur les poissons âgées de 70 dpf ou bien un mois après la fin du traitement sur des poissons âgés de 90 dpf. Malheureusement, nous n'avons pas remarqué de déplétion des cellules germinales dans les gonades des individus analysés par histologie, y compris pour la dose la plus forte de 160 mg de busulfan/kg d'aliment. Il en est de même au niveau moléculaire pour lequel les traitements n'ont pas impacté le profil d'expression de gènes marqueurs de types cellulaires tels que *vasa*, *cyp19a1a* et *amh*. Nous émettons plusieurs hypothèses pour ce résultat négatif. 1) La structure et les propriétés physico-chimiques du busulfan ont-ils pu être altérées pendant l'intégration de celui-ci à l'aliment ? 2) Le busulfan se dilue-t-il dans l'eau au moment où

l'aliment est versé dans les bassins et par conséquent, les poissons ingèrent des doses trop faibles pour qu'il y ait un impact au niveau des gonades ? 3) La molécule de busulfan est-elle catabolisée dans le tractus digestif avant d'arriver au niveau des gonades ?

Discussion sur l'intégration et les limites de ces travaux de recherche pour l'aquaculture

Actuellement, la stagnation des produits de pêche et la consommation alimentaire croissante en protéines d'origine aquatique contraignent l'aquaculture à répondre au défi de l'intensification écologique. La stérilisation des espèces aquacoles est recherchée en aquaculture pour remédier à deux problèmes principaux. D'une part, la reproduction peut affecter la croissance, la résistance immunitaire et/ou la qualité de chair de nombreuses espèces piscicoles. C'est notamment le cas du tilapia du Nil pour lequel sa reproduction précoce et continue affecte fortement la croissance des femelles. D'autre part, la fuite d'individus domestiqués fertiles en dehors des zones d'élevage peut engendrer des risques de pollutions génétiques dans le milieu naturel par le biais de leur reproduction avec des individus sauvages. La triploïdisation est aujourd'hui la technique considérée comme la plus efficace, la plus pratique et la plus économique pour la production de poissons stériles à grande échelle (Maxime, 2008). Même si la réglementation de la Commission Européenne ne considère pas les poissons triploïdes comme des OGM (Directive 2001/18/EC Parlement Européen – Article 2 – Annexe IA – partie 2), les avis des consommateurs et associations écologiques vis-à-vis de ces manipulations chromosomiques restent discutés (Piferrer *et al.*, 2009). Ainsi, un traitement alternatif, non chromosomique mais écologique, probablement mieux accepté par le consommateur, constitue un enjeu majeur pour l'aquaculture. Dans ce contexte, un traitement par de fortes températures semble être une alternative possible.

Conclusion

- **Induction de la stérilité par la température**

Ce travail a montré qu'un traitement à 37°C pendant 60 jours était nécessaire pour induire la stérilité des deux sexes chez le tilapia du Nil de la souche Manzala.

Nous avons montré qu'un traitement à la haute température de 37°C peut induire une stérilisation partielle et transitoire, avec l'élimination des cellules germinales dans certaines zones de la gonade, ou une stérilisation complète et pérenne, avec l'absence totale de cellules germinales, dans les gonades des femelles et mâles tilapias du Nil (*Oreochromis niloticus*, Manzala).

La spermatogénèse semble moins sensible que l'ovogenèse à une exposition à de fortes températures de 37°C. En effet, nous avons observé un pourcentage plus élevé de phénotypes gonadiques stériles STL et TSL chez les descendances 100% femelles des alevins traités à 37°C. Ces résultats suggèrent que les cellules germinales mâles seraient moins sensibles à l'induction de la stérilisation par les hautes températures que les cellules germinales femelles.

L'immunomarquage de la protéine Vasa, marqueur des cellules germinales, nous a permis de confirmer que la désorganisation cellulaire des gonades femelles et mâles stériles STL et TSL est en partie due à la disparition des cellules germinales.

A notre connaissance, ce travail de recherche est le premier à avoir caractérisé certains des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'élimination des cellules germinales pendant une stérilisation induite par la température chez le tilapia du Nil. Nous avons effectivement identifié que l'apoptose des cellules germinales est mise en jeu dans la perte de celles-ci, comme déjà démontré chez d'autres espèces de poissons telles que le zebrafish (Rodriguez-Mari *et al.*, 2010) et le pejerrey (Ito *et al.*, 2003). En plus de ce mécanisme, une baisse de la prolifération cellulaire, ainsi que l'inhibition de l'expression de gènes marqueurs de types cellulaires (*vasa*/cellules germinales ; *cyp19a1a*/cellules somatiques de la granulosa chez les femelles et *amh*/cellules somatiques de Sertoli chez les mâles) semblent aussi être à l'origine de cette déplétion dans les gonades traitées des femelles et mâles tilapias du Nil.

- **Induction de la stérilité par une molécule chimique le busulfan**

Quelque soit le mode d'administration du busulfan, par injection ou *vial* l'alimentation, le traitement ne semble pas avoir impacté le sex-ratio et donc le phénotype gonadique des individus traités par rapport aux individus contrôles.

Cette observation est validée par la visualisation de la structure cellulaire des gonades, qui paraît être identique entre les groupes traités et contrôles.

Par analyse du profil d'expression de 3 gènes d'intérêt, identiques entre les animaux traités et contrôles, nous confirmons que le traitement par le busulfan ne semble pas avoir impacté ni les cellules germinales, ni les cellules somatiques mâles ou femelles chez les poissons traités au busulfan, quelque soit le sexe de la descendance (100% mâle ou 100% femelle).

Malgré l'effet toxique visible par la baisse du taux de survie chez les individus traités, la dose injectée en intra-péritonéal de 40 mg de busulfan/kg ne semble pas avoir été suffisante pour induire la stérilité de notre souche Bouaké de tilapia.

L'administration du busulfan dans l'aliment, quelle que soit la dose utilisée (40, 80 ou 160 mg de busulfan/kg d'aliment), augmente fortement le taux de survie des individus traités comparativement à l'injection intra-péritonéale (respectivement une moyenne de 98% de survie dans les lots nourris avec l'aliment contenant le busulfan et 59% de survie pour le lot injecté). Par contre, même avec une dose très élevée de 160 mg de busulfan/kg d'aliment, ce mode d'administration du busulfan ne semble pas avoir impacté la gonade des individus traités. Il conviendrait alors d'investiguer si, lors de la manipulation d'incorporation du busulfan dans l'aliment, cette molécule ne serait pas dégradée.

Perspectives

- **Température**

De nombreuses perspectives peuvent être envisagées pour approfondir ce travail.

Par l'effet de fortes températures, des individus stériles (SG) et partiellement stériles (PSG) ont été obtenus. Parmi les PSG, le taux d'apoptose est anormalement plus élevé que chez les témoins. Cette apoptose peut affecter les cellules germinales ou somatiques chez les 2 sexes. Il serait pertinent de pouvoir discriminer quel(s) type(s) cellulaire(s) est en apoptose car s'il y a un effet au niveau des cellules germinales, celui-ci est certainement insuffisant pour toutes les éliminer. Cette apoptose peut affecter les cellules germinales et/ou les cellules somatiques que sont les Sertoli et les cellules de Leydig pour le mâle et les cellules de la granulosa et de la thèque pour la femelle. Il serait pertinent de distinguer quel type cellulaire est dégradé, ce qui pourrait être fait en utilisant un marqueur apoptotique comme la Caspase 3. Ainsi, les cellules pourraient être identifiées avec un anticorps dirigé contre la Caspase-3. Il serait intéressant de faire une hybridation parallèle avec des marqueurs des cellules somatiques : pour le mâle : un marqueur des cellules de Sertoli (comme un anticorps contre l'Amh) et également utiliser un marqueur pour les cellules de Leydig (avec par exemple un anticorps contre une enzyme de la stéroïdogénèse mâle comme le Cyp11b1) et pour la femelle: un

marqueur des cellules de la granulosa (un anticorps contre l'aromatase gonadique / cyp19a1a) et un marqueur des cellules de la thèque (anticorps contre la 3B-HSD). Idéalement tous les anticorps devraient avoir des fluorochromes différents et avoir été produits sur des animaux différents pour qu'ils puissent être utilisés ensemble sans risques de croisement.

Nous avons démontré l'impact du traitement 37°C sur les cellules germinales et somatiques chez les 2 sexes à travers l'analyse expressionnelle de nos gènes marqueurs. Il serait pertinent de pratiquer des cultures *in vitro* pour suivre la cinétique de la dégénérescence des différents types cellulaires germinaux et somatiques lors d'une stérilisation induite par les fortes températures. Pour ceci, il s'agirait de réaliser 3 cultures cellulaires différentes (cellules germinales seules, cellules somatiques seules et co-culture cellules germinales/cellules somatiques) dans 2 conditions de températures, contrôle à 27°C et haute température à 37°C. Cette technique nous permettrait de quantifier les cellules et de pratiquer la transcriptomique, après digestion cellulaire, afin d'analyser des gènes candidats.

Nous avons plus d'informations sur la durée minimale de traitement qui est de 60 jours. Pour analyser plus efficacement l'impact du traitement de 37°C, nous pouvons également réaliser la technique de transcriptomique sur des gonades entières prélevées pendant, à la fin et après le traitement (30, 45, 60, 90 ... DT). Il s'agirait alors de comparer la transcriptomique de tous les gènes d'intérêt entre les 27°C et les 37°C, mais aussi entre femelles et mâles.

Pour approfondir l'analyse de la cinétique de la disparition des cellules germinales et leur potentielle recolonisation dans les gonades traitées, 2 techniques sont envisagées : l'obtention de lignée vasa-GFP chez le tilapia du Nil et l'utilisation de lacytométrie en flux. Au début de mes travaux de recherches doctorales, il était question qu'un de nos partenaires internationaux (Tom Kocker, USA) nous transmette cette lignée. Malheureusement, la technique n'ayant pu aboutir dans les délais, nous avons mis au point une approche plus quantitative, la cytométrie en flux. Cette dernière a l'avantage de permettre une quantification rapide et à grande échelle de types cellulaires *via* des marqueurs spécifiques. Par contre, nos fortes mortalités et la petite taille des gonades chez les alevins rendant disponible peu de matériel biologique, nous n'avons pas pu poursuivre nos investigations. En ce qui concerne la création d'individus transgéniques vasa-GFP chez le tilapia, cela serait un outil très pertinent pour suivre plus rapidement l'évolution du nombre de cellules germinales.

L'amélioration du taux des survies est donc indispensable pour obtenir une quantité plus importante de matériel biologique à analyser et nécessaire pour vérifier si la variabilité de réponse de 0 à 100% de stérilité est validée.

Si nous émettons l'hypothèse que la masculinisation repose sur les mêmes mécanismes que ceux de la stérilisation, à savoir une diminution du nombre de cellules germinales (partielle pour la première et totale pour la seconde), il serait alors intéressant d'étudier une potentielle corrélation entre le pourcentage de thermosensibilité (ou masculinisation) et le pourcentage de stérilisation d'une même descendance. De plus, Devlin et Nagahama (2002) ont détecté la présence de *cyp19a1a* dans les cellules de la granulosa des femelles tilapias âgées de 14 dpf, par hybridation *in situ* et immunohistochimie ; la répression de l'expression de *cyp19a1a* pourrait être due à une baisse du nombre des cellules de la granulosa chez nos XX-37°C stériles ou masculinisées. Il conviendrait de vérifier ceci en procédant à un immunomarquage de nos coupes avec la protéine Cyp19a1a et la protéine Amh (impliquée dans le développement testiculaire et un bon marqueur des cellules de Sertoli), et à une quantification protéique par Elisa. Il serait aussi intéressant de compléter mes données avec le dosage des niveaux d'hormones sexuelles stéroïdiennes dans le plasma et dans les gonades. De plus, il serait judicieux de regarder les effets d'un traitement 37°C stérilisant sur le système nerveux central (SNC), en analysant par exemple les taux de GnRH, de GtH, d'aromatase cérébrale et d'Amh cérébrale.

- **Busulfan**

Il serait intéressant d'envoyer pour analyse à un laboratoire de chimie un échantillon d'aliment dans lequel a été introduit le busulfan à différentes doses, afin de savoir si la structure et les propriétés physico-chimiques de la molécule de busulfan sont intactes ou si elles ont été altérées lors de cette manipulation.

Il serait également intéressant de faire la même procédure avec un échantillon de l'eau des bassins des individus traités à l'aliment. Peut-être que le busulfan se dégrade au contact de l'eau et serait donc ingéré en trop faible quantité par les poissons pour avoir un effet sur leurs gonades.

Sinon peut-être est-ce un problème de métabolisme de la molécule dans le tractus digestif des poissons. Contrairement aux hormones, les molécules de busulfan seraient dégradées lors de la digestion et, de ce fait, ne pourraient agir sur les gonades des poissons traités.

Bibliographie

Articles de périodiques imprimés

- Abbas HH, Abbas WT. 2011. Assessment study on the use of Pawpaw; *Carica papaya* seeds to control *Oreochromis niloticus* breeding. Pak J Biol Sci 14: 1117-23.
- Alvarenga ER & França LR. 2009. Effects of different temperatures on testis structure and function, with emphasis on somatic cells, in sexually mature Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Biol Reprod 80:537-544.
- Arai K. 2001. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. Aquaculture 197:205-228.
- Aramaki S *et al.* 2013. A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants. Dev Cell 27:516-529.
- Arrango NA, Lovell-Badge R, Behringer RR. 1999. Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter : in vivo definition on genetic pathways of vertebrate sexual development. Cell 99:409-419.
- Bachvarova RF, Crother BI, Manova K, Chatfield J, Shoemaker CM, Crews DP, Johnson AD. 2009. Expression of *Dazl* and *Vasa* in turtle embryos and ovaries: evidence for inductive specification of germ cells. Evol Dev 11: 525-34.
- Baroiller JF & Jalabert B. 1989. Contribution of research in reproductive physiology to the culture of tilapia. Aquat Liv Resour 2:105-116.
- Baroiller JF, Chourrout D, Fostier A & Jalabert B. 1995a. Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. J Exp Zool 273:216-223.
- Baroiller JF & Clota F. 1998. Interaction between temperature effects and genotype on *Oreochromis niloticus* sex determination. J Exp Zool 281:507.
- Baroiller JF, Guiguen Y, Fostier A. 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. Cell Mol Life Sci 55:910-931.
- Baroiller JF & D'Cotta H. 2001. Environment and sex determination in farmed fish. Comp Biochem Physiol C 130:399-409.
- Baroiller JF, D'Cotta H, Bezault E, Wessels S, Hoerstgen-Schwark G. 2009a. Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. Comp Biochem Physiol A 153:30-38.
- Baroiller JF, D'Cotta H, Saillant E. 2009b. Environmental effects on fish sex determination and differentiation. Sex Dev 3(2-3):118-35.
- Baroiller JF, D'Cotta H, Shved N, Berishvili G, Toguyeni A, Fostier A, Eppler E, Reinecke M. 2014. Oestrogen and insulin-like growth factors during the reproduction and growth of the tilapia *Oreochromis niloticus* and their interactions. Gen Comp Endocrinol 205:142-50.
- Baron D, Cocquet J, Xia X, Fellous M, Guiguen Y, Veitia RA. 2004. An evolutionary and functional analysis of *Foxl2* in rainbow trout gonad differentiation. J Mol Endocrinol 33:705-715.

- Baron D, Houlgatte R, Fostier A, Guiguen Y. 2005. Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biol Reprod* 73:959–966.
- Barske LA & Capel B. 2008. Blurring the edges in vertebrate sex determination. *Curr Opin Genet Dev* 18(6):499-505.
- Bayir H, Kagan VE. 2008. Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis-there is nothing more practical than a good theory. *Crit Care* 12:206.
- Beardmore JA, Mair GC, Lewis RI. 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture* 197:283-301.
- Bedford JM. 2015. Human Spermatozoa and Temperature : The Elephant in the Room. *Biol Reprod* 93:97, 1-5
- Benfey TJ. 2015. Effectiveness of triploidy as a management tool for reproductive containment of farmed fish: Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a case study. *Aquaculture* 7:1-19.
- Bezault E, Clota F, Derivaz M, Chevassus B, Baroiller JF. 2007. Sex determination and temperature-induced sex differentiation in three natural populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) adapted to extreme temperature conditions. *Aquaculture* 272: S3-S16.
- Bezault E, Balaesque P, Toguyeni A, Fermon Y, Araki H, Baroiller JF, Rognon X. 2011. Spatial and temporal variation in population genetic structure of wild Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) across Africa. *BMC Genet* 12:102.
- Bhandari RK, Nakamura M, Kobayashi T, Nagahama Y. 2006. Suppression of steroidogenic enzyme expression during androgen induced sex reversal in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Gen Comp Endocrinol* 145:20-24.
- Bishop CE, Whitworth DJ, Qin Y, AgoulNIK AI, AgoulNIK IU, Harrison WR, Behringer RR, Overbeek PA. 2000. A transgenic insertion upstream of *sox9* is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat Genet* 26:490-494.
- Bodharkar SL, Garg SK, Mathus VS. 1974. Antifertility screening part IX. Effect of five indigenous plants on early pregnancy in female albino rats. *Indian J of Medical Res* 62:831-837.
- Braat AK, van de Water S, Goos H, Bogerd J, Zivkovic D. 2000. Vasa protein expression and localization in the zebrafish. *Mech Dev* 95:271-274.
- Bridges PJ, Brusie MA, Fortune JE. 2005. Elevated temperature (heat stress) in vitro reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. *Domest Anim Endocrinol* 29:508-522.
- Brinster RL, Avarbock MR. 1994a. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11303-7.
- Brinster RL, Zimmermann JW. 1994b. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11298-302.

- Brinster RL. 2002. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science* 296:2174-75.
- Brown JL and Chakraborty PK. 1991. Comparison of compensatory pituitary and testicular responses to hemicastration between prepubertal and mature rats. *J. Androl.* 12:119-125.
- Cadigan KM et Nusse R. 1997. Wnt signaling a common theme in animal development. *Genes Dev* 11(24):3286-305.
- Chaboissier MC, Kobayashi A, Vidal VIP, Lützkendorf S, van de Kant HJK, Wegner M. 2004. Functional analysis of *Sox8* and *Sox9* during sex determination in the mouse. *Development* 131:1891-1901.
- Chang X, Kobayashi T, Senthilkumaran B, Kobayashi-Kajura H, Sudhakumari CC, Nagahama Y. 2005. Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen Comp Endocrinol* 141:101-115.
- Chassot AA, Bradford ST, Auguste A, Gregoire EP, Pailhoux E, de Rooij DG, Schedl A, Chaboissier MC. 2012. WNT4 and RSPO1 together are required for cell proliferation in the early mouse gonad. *Development* 139:4461-4472.
- Chevassus-au-Louis B & Lazard J. 2009. Current situation and prospects for international fish farming: Consumption and production. *Cahiers Agricultures* 18:82-90.
- Chiang EF, Pai CI, Wyatt M, Yan YL, Postlethwait J, Chung B. 2001. Two *sox9* genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev Biol* 231:149-163.
- Choi YJ, Ok DW, Kwon DN, Chung JI, Kim HC, Yeo SM, Kim T, Seo HG, Kim JH. 2004. Murine male germ cell apoptosis induced by busulfan treatment correlates with loss of c-kit-expression in a Fas/FasL- and p53-independent manner. *FEBS* 575(1-3):41-51.
- Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, Korach KS. 1999. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science*. 286:2328-2331.
- D'Cotta H, Guiguen Y, Govoroun MS, McMeel O, Baroiller JF. 2001a. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol Reprod Dev* 59:265-276.
- D'Cotta H, Fostier A, Guiguen Y, Govoroun M, Baroiller JF. 2001b. Search for the molecular mechanisms implicated in the thermosensitivity of sex gonadal differentiation of tilapia fish; differential approach and expression of candidate genes. *J ExpZool* 290:574-585.
- D'Cotta H, Pepey E, Wessels S, Poonlaphdecha S, Reinelt B, Hörstgen-Schwark G and Baroiller JF. 2008. Temperature-induced male differentiation in the Nile tilapia: gonad gene expression using female monosex populations and divergent thermo-sensitive lines. *Sexual Development* 2:281.

- Das RP. 1980. Effect of papaya seed on the genital organs and fertility of male rats. *Indian J Exp Biol* 18:408-409.
- Desprez D & Mélard C. 1998. Effect of ambient water temperature on sex determinism in the blue tilapia, *Oreochromis aureus*. *Aquaculture* 162:79-84.
- Desprez, D., Geraz, E., Hoareau, M.C., Melard, C., Bosc, P., and Baroiller, J.F., 2003. Production of a high percentage of male offspring with a natural androgen 11 β -hydroxy-androstenedione (11 β OHA4) in Florida red tilapia. *Aquaculture* 216:55-65.
- Devlin RH & Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208:191-364.
- Diana JS. 2009. Aquaculture production and biodiversity conservation. *Biosciences* 9(1):27-38.
- di Clemente N, Seroka A, Sonigo C, Pierre A, Taieb J, Grynberg M. 2014. Anti-müllerian hormone: advances on its regulation and biological effects in women. *mt Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie* 16:3-15.
- DiNapoli L, Capel B. 2007. Germ cell depletion does not alter the morphogenesis of the fetal testis or ovary in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta*). *Journal Exp Zool B* 308B:236-41.
- DiNapoli L et Capel B. 2008. SRY and the standoff in sex determination. *Mol End* 22:1-9.
- Dorrington JH, Moon YS, Armstrong DT. 1975. Estradiol-17 β biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats: stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 97:1328-1331.
- Dranow DB, Tucker RP, Draper BW. 2013. Germ cells are required to maintain a stable sexual phenotype in adult zebrafish. *Development Biology* 376:43-50.
- Fenske M & Segner H. 2004. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 67:105-126.
- Fernandino JI, Hattori RS, Kimura H, Strüssmann CA, Somoza GM. 2008b. Expression profile and estrogenic regulation of anti-Müllerian hormone during gonadal development in pejerrey *Odontesthes bonariensis*, a teleost fish with strong temperature-dependent sex determination. *Dev Dyn* 237:3192-3199.
- Fitzpatrick SL & Richards JS. 1991. Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger RNA and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. *Endocrinology* 129:1452-1462.
- Gallien L & Durocher M. 1957. Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltl*. *Bull biol France, Belgique* 91:97-114.
- Gary SK & Garg JP. 1971. Antifertility screening VII. Effect of five indigenous plant parts on early pregnancy in albino rats. *Indian J of Medical Res* 56:302-306.
- George TT. 1997. Saltwater culture of tilapias and possible commercial application in Canada. *Bull Aquacult Assoc Canada* 97:42-44.

- Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110:521-528.
- Glover KA, Pertoldi C, Besnier F, Wennevik V, Kent M, Skaala Ø. 2013. Atlantic salmon populations invaded by farmed escapees: quantifying genetic introgression with a Bayesian approach and SNPsBMC. *Genetics* 14:74.
- Golan M & Levavi-Sivan B. 2014. Artificial masculinization in tilapia involves androgen receptor. *Gen Comp End* 207:50-55.
- Goto R, Saito T, Takeda T, Fujimoto T, Takagi M, Arai K, Yamaha E. 2012. Germ cells are not the primary factor for sexual fate determination in goldfish. *Dev Biol* 370:98-109.
- Govoroun M, McMeel OM, D'Cotta H, Ricordel MJ, Smith TJ, Fostier A, Guiguen Y. 2001. Steroid enzyme gene expressions during natural and androgen-induced gonadal differentiation in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J Exp Zool* 290:558-566.
- Graves JA & Peichel CL. 2010. Are homologies in vertebrate sex determination due to shared ancestry or to limited options? *Genom Biol* 11:205.
- Guan G, Kobayashi T, Nagahama Y. 2000. Sexually dimorphic expression of two types of DM (Doublesex / Mab-3) – Domain genes in a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochem Biophys Res Commun* 272: 662-666.
- Guerrero RD III & Guerrero LA. 1988. Feasibility of commercial production of sex-reversed Nile tilapia fingerlings in the Philippines. In: Pullin RSV, Bhukaswan T, Tonguthai K & Maclean JL (eds) *Proceedings of the 2nd International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. Department of Fisheries, Bangkok, Thailand, and ICLARM, Manila, Philippines. ICLARM Conf Proc 15:183-186.
- Guigon CJ & Magre S. 2006. Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: insights from models of germ cell depletion. *Biol Reprod* 74:450-8.
- Guignon CJ, Coudouel N, Mazaud-Guittot S, Forest MG, Magre S. 2005. Follicular cells acquire sertoli cell characteristics after oocyte loss. *Endocrinology* 146:2992-3004.
- Guiguen Y, Baroiller JF, Ricordel MJ, Iseki K, Mcmeel OM, Martin SA, Fostier A. 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol Reprod Dev* 54:154-162.
- Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, Chang CF. 2009. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen Comp Endocrinol* 165:352-366.
- Guo Y, Cheng H, Huang X, Gao S, Yu H, Zhou R. 2005. Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish *Dmrt1*. *Biochem Biophys Res Commun* 330:950-957.
- Gustafon, EA, Wessel, GM. 2011. *Vasa genes: Emerging roles in the germ line and in multipotent*. Providence.

- Hallett JS & Wentworth BC. 1991. The effects of busulphan on gonadal differentiation and development in Japanese quail (*Coturnixcoturnix japonica*). Poultry Science 70:1619-1623.
- Halm S, Rocha A, Miura T, Prat F, Zanuy S. 2007. Anti-Müllerian hormone (AMH/AMH) in the European sea bass: its gene structure, regulatory elements, and the expression of alternatively-spliced isoforms. Gene 388:148-158.
- Hartung O, Forbes MM, Marlow FL. 2014. Zebrafish vasa is required for germ-cell differentiation and maintenance. Mol Reprod Dev 81:946-961.
- Hattori RS, Murai Y, Oura M, Masuda S, Majhi SK, Sakamoto T, Fernandino JI, Somoza GM, Yokota M, Strüssmann CA. 2012. A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. PNAS 109:2955-9.
- Hay B, Jan LY, Jan, YN. 1988. A protein component of Drosophila polar granules is encoded by vasa and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. Cell 55:577-587.
- Herpin A, Schindler D, Kraiss A, Hornung U, Winkler C, Scharl M. 2007. Inhibition of primordial germ cell proliferation by the medaka male determining gene Dmrt1bY. BMC Dev Biol 7:99.
- Hickling CF. 1960. The Malacca tilapia hybrids. J Genet 57:1-10.
- Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J. 1999. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. Am J Med Genet 87:349-353.
- Hussain MG, Chatterji A, McAdrew BJ, Johnstone R. 1991. Triploidy induction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, using pressure, heat and cold shocks. Theor Appl Genet 81:6-12.
- Ijiri S, Kaneto H, Kobayashi T, Wang DS, Sakai F, Paul-Prasanth B, Nakamura M, Nagahama Y. 2008. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Biol Reprod 78:333-41.
- Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, Parker KL. 1994. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. Mol Endocrinol 8:654-662.
- Ikenishi K, Tanaka T, Komiya T. 1996. Spatio-temporal distribution of the protein of *Xenopus* vasa homologue (*Xenopus* vasa-like gene 1, XVLG1) in embryos. Dev. Growth Differ 38:527-535.
- Irie N, Tang WWC, Surani MA. 2014. Germ cell specification and pluripotency in mammals: a perspective from early embryogenesis. Reprod Med Biol 13:203-215.
- Ito LS, Yamashita M, Strüssmann CA. 2003. Histological process and dynamics of germ cell degeneration in pejerrey *Odontesthes bonariensis* larvae and juveniles during exposure to warm water. J Exp Zool A Comp Exp Biol 297:169-179.
- Ito LS, Cornejo AM, Yamashita M, Strüssmann CA. 2008a. Thermal threshold and histological process of heat-induced sterility in adult pejerrey (*Odontesthes bonariensis*): a comparative analysis of laboratory and wild specimens. Physiol Biochem Zool 81:775-784.

- Ito LS, Takahashi C, Yamashita M, Strüssmann CA. 2008b. Warm water induces apoptosis, gonadal degeneration, and germ cell loss in sub-adult pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atheriniformes). *Physiol Biochem Zool* 81:762-774.
- Jacob S & Lovell-Badge R. 2011. Sex determination and the control of SOX9 expression in mammals. *Febs Journal* 278:1002-1009.
- Karaca AG, Parker HM, Yeatman JB, McDaniel CD. 2002. The effects of heat stress and sperm quality classification on broiler breeder male fertility and semen ion concentrations. *Br Poult Sci* 43:621-8.
- Karlsen HE, Piddington RW, Enger PS, Sand A. 2004. Infrasound initiates directional fast-start escape responses in juvenile roach *Rutilus rutilus*. *J Exp Biol* 207:4185-4193.
- Kim Y & Capel B. 2006. Balancing the bipotential gonad between alternative organ fates : A new perspective on an old problem. *Dev Dyn* 235:2292-2300.
- Kitano T, Takamune K, Nagahama Y, Abe SI. 2000. Aromatase inhibitor and 17 α -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol Reprod Dev* 56:1-5.
- Klüver N, Pfennig F, Pala I, Storch K, Schlieder M, Froschauer A, Gutzeit HO, Scharl M. 2007. Differential expression of anti-Müllerian hormone (*amh*) and anti-Müllerian hormone receptor type II (*amhrII*) in the teleost medaka. *Dev Dyn* 236:271-281.
- Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Nagahama Y. 2000. Differential expression of vasa homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mech Dev* 99:139-42.
- Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Nagahama Y. 2002. Two isoforms of vasa homologs in a teleost fish: their differential expression during germ cell differentiation. *Mech Develop* 111:167-171.
- Kobayashi T, Matsuda M, Kajiura-Kobayashi H, Suzuki A, Saito N, Nakamoto M, Shibata N, Nagahama Y. 2004. Two DM domain genes, *DMY* and *DMRT1*, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev Dyn* 231:518-526.
- Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Guan G, Nagahama Y. 2008. Sexual dimorphic expression of *DMRT1* and *Sox9a* during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Dev Dyn* 237:297-306.
- Kobayashi T & Nagahama Y. 2009. Molecular aspects of gonadal differentiation in a teleost fish, the Nile tilapia. *Sex Dev* 3:108-117.
- Kobayashi T. 2010. In vitro germ cell differentiation during sex differentiation in a teleost fish. *Int J Dev Biol* 54:105-111.
- Koopman P, Munsterberg A, Capel B et al. 1990. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348:450-452.

- Koulisch S, Kramer CR, Grier HJ. 2002. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). *J Morphol* 254:292-311.
- Kurokawa H, Saito D, Nakamura S, Katoh-Fukui Y, Ohta K, Baba T, Morohashi K, Tanaka M. 2007. Germ cells are essential for sexual dimorphism in the medaka gonad. *Proc Natl AcadSci USA* 104:16958-63.
- Kwon JY, Haghpanah V, Kogson-Hurtado LM, McAndrew BJ & Penman DJ. 2000a. Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary Administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. *J Exp Zool* 287:46-53.
- Kwon JY, McAndrew BJ, Penman DJ. 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *MolReprod Dev* 59:359-70.
- Lacerda SMSN, Batlouni SR, Silva SBG, homem CSP, França LR. 2006. Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. *Anim Reprod* 3:146-159.
- Lawson KA, Meneses JJ, Pedersen RA. 1991. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development* 113:891-911.
- Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, Korving JP, Hogan BL. 1999. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 13:424-436.
- Lee KH, Yamaguchi A, Rashid H, Kadomura K, Yasumoto S, Matsuyama M. 2009. Germ Cell Degeneration in High-Temperature Treated Pufferfish, *Takifugurubripes*. *Sex Dev* 3:225-232.
- Linhart O, Rodina M, Flajshans M, Mavrodiiev N, Nebesarova J, Gela D, Kocour M. 2006. Studies on sperm of diploid and triploid tench, *Tinca tinca* (L.). *Aquaculture* 14:9-25.
- Liu Z, Wu F, Jiao B, Zhang X, Hu C, Huang B, Zhou L, Huang X, Wang Z, Zhang Y, Nagahama Y, Cheng CH, Wang D. 2007. Molecular cloning of doublesex and mab-3-related transcription factor 1, forkhead transcription factor gene 2, and two types of cytochrome P450 aromatase in Southern catfish and their possible roles in sex differentiation. *J Endocrinol* 194:223-241.
- Maatouk, DM, DiNapoli L, Alvers A, Parker KL, Taketo MM, Capel B. 2008. Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum Mol Genet.* 17:2949-2955.
- MadjhiSk, Hattori RS, Rahman SkM, Suzuki T, Strüsmann CA. 2009. Experimentally induced depletion of germ cells in sub-adult Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*). *Theriogenology* 71:1162-1172.
- Mair GC, Abucay JS, Beardmore JA, Skibinski DOF. 1995. Growth performance trials of genetically male tilapia (GMT) derived from YY-males in *Oreochromis niloticus* L.: on stations comparisons with mixed sex and sex reversed male populations. *Aquaculture* 137:313-322.
- Magre S & Jost A. 1991. Sertoli cells and testicular differentiation in the rat fetus. *J Electron Microsc Tech* 19:172-188.

- Manivannan B, Mittal R, Goyal S, Ansari AS, Lohiya NK. 2009. Sperm characteristics and ultrastructure of testes of rats after long-term treatment with the methanol subfraction of *Caricapapaya* seeds. *As Jour And* 11:583-599.
- Mank JE & Avise JC. 2009. Evolutionary diversity and turn-over of sex determination in teleost fishes. *Sex Dev* 3(2-3):60-7.
- Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C., Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S, Sakaizumi M. 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417:559-563.
- Matsuda M, Sato T, Toyazaki Y, Nagahama Y, Hamaguchi S, Sakaizumi M. 2003. *Oryziascurvinotus* has DMY, a gene that is required for male development in the medaka, *O. latipes*. *ZoologSci* 20:159-61.
- Matsuda Y, Nishida-Umehara C, Tarui H, Kuroiwa A, Yamada K, Isobe T, Ando J, Fujiwara A, Hirao Y, Nishimura O, Ishijima J, Hayashi A, Saito T, Murakami T, Murakami Y, Kuratani S, Agata K. 2005. Highly conserved linkage homology between birds and turtles: birds and turtle chromosomes are precise counterparts of each other. *Chromosome Res* 13:601-615.
- Matsuda M, Shinomiya M, Kinoshita M, Suzuli A, Kobayashi T, Paul-Prasanth B, Lau EL, Hamaguchi S, Sakaizumi M, Nagahama Y. 2007. DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proc Natl AcadSci USA* 104(10):3865-70.
- Maxime V. 2008. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish Fish.* 9:67-78.
- McAllister BG & Kime DE. 2003. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). *AquatToxicol* 65:309-316.
- McLaren A. 1991. Development of the mammalian gonad: the fate of the supporting cell lineage. *Bio Essays* 13:151-156.
- McLaren A. 1994. Germline and soma : interactions during early mouse development. *Sem in Dev Biol* 5:43-49.
- McLaren A & Southee D. 1997. Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Dev Biol* 187:107-113.
- McLaren A. 1998. Germ cells and germ cell transplantation. *Int J Dev Biol* 42:855-860.
- Mélard C. 1995. Production of a high percentage of male offspring with 17 α -ethynylestradiol sex-reversed *Oreochromis aureus*. 1. Estrogen sex-reversal and production of F2 pseudofemales. *Aquaculture* 130:25-34.
- Miura T, Miura C, Konda Y, Yamauchi K. 2002. Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. *Development* 129:2689–2697.

- Modi WS & Crews D. 2005. Sex chromosomes and sex determination in reptiles - Commentary. *Curr Opin Genet Dev* 15:660-665.
- Morinaga C, Saito D, Nakamura S, Sasaki T, Asakawa S, Shimizu N, Mitani H, Furutani-Seiki M, Tanaka M, Kondoh H. 2007. The hotei mutation of medaka in the anti-Mullerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. *Proc Natl AcadSci USA* 104(23):9691-6.
- Morishima K, Yoshikawa H, Arai K. 2008. Meiotic hybridogenesis in triploid *Misgurnus* loach derived from a clonal lineage. *Heredity* 100:581-586.
- Murray SM, Yang SY, Van Doren M. 2010. Germ cell sex determination: a collaboration between soma and germline. *Curr Opin Cell Biol* 22:722-9.
- Myosho T, Otake H, Masuyama H, Matsuda M, Kuroki Y, Fujiyama A, Naruse K, Hamaguchi S, Sakaizumi M. 2012. Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias latipes*. *Genetics* 191:163-70.
- Nakamoto M, Suzuki A, Matsuda M, Nagahama Y, Shibata N. 2005. Testicular type *Sox9* is not involved in sex determination but might be in the development of testicular structures in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun* 333:729-736.
- Nakamoto M, Matsuda M, Wang DS, Nagahama Y, Shibata N. 2006. Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *Foxl2* in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun* 344:353-361.
- Nakamoto M, Wang DS, Suzuki A, Matsuda M, Nagahama Y, Shibata N. 2007. *Dax1* suppresses *P450arom* expression in medaka ovarian follicles. *Mol Reprod Dev* 74(10):1239-46.
- Nakamura M. 2013. Morphological and physiological studies on gonadal sex differentiation in teleost fish. *ABSM* 6:1-47.
- Nakamura M & Takahashi H. 1973. Gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica*, with special regard to the time of estrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males. *Bull Fac Fish Hokkaido Univ* 24:1-13.
- Nakamura M, Kobayashi T, Chang XT, Nagahama Y. 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *Jour of exp zool* 281:362-372.
- Nakamura M, Bhandari RK, Higa M. 2003. The role estrogens play during sex differentiation and sex change in fish. *Fish Physiol Biochem* 28:113-117.
- Nakamura S, Aoki Y, Saito D, Kuroki Y, Fujiyama A, Naruse K, Tanakai M. 2008. *Sox9b/sox9a2*-EGFP Transgenic Medaka Reveals the Morphological Reorganization of the Gonads and a Common Precursor of Both the Female and Male Supporting Cells. *Mol Reprod Dev* 75:472-476.

- Nakamura M, Nozu R, Ijiri S, Kobayashi T, Hirai T, Yamaguchi Y, Seale A, Lerner DT, Grau GE. 2015. Sexual characteristics of high-temperature sterilized male Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zool Letters* 1:21.
- Nanda I., Kondo M., Hornung U., Asakawa S., Winkler C., Shimizu A, Shan Z, Haaf T, Shimizu N, Shima A, Schmid M, Scharl M., 2002. A duplicated copy of DMRT1 in the sex determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11778-11783.
- Nef S, Schaad O, Stallings NR, Cederroth CR, Pitetti JL, Schaer G, Malki S, Dubois-Dauphin M, Boizet-Bonhoure B, Descombes P. 2005. Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Dev Biol* 287:361-377.
- Nef S & Vassalli JD. 2009. Complementary pathways in mammalian female sex determination. *Journal of biology* 8:74.
- Nishimura T, Tanaka M. 2014. Gonadal development in fish. *Sex Dev* 8:252-261.
- Nyingi D, De Vos L, Aman R, Agnese JF. 2009. Genetic characterization of an unknown and endangered native population of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae; Teleostei) in the Lobo swamp (Kenya). *Aquaculture* 297:57-63.
- Ogawa T, Aréchaga JM, Avarbock MR, Brinster LR. 1997. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol* 41:111-22.
- Oshima Y, Hayashi T, Tokunaga S, Nakamura M. 2005a. Wnt4 expression in the differentiating gonad of the frog *Rana rugosa*. *Zoolog Sci* 22:689-693.
- Oshima K, Morishima K, Yamaha E, Arai K. 2005b. Reproductive capacity of triploid loaches obtained from Hokkaido Island, Japan. *Ichthyol Res* 52:1-8.
- Ottolenghi C, Omari S, Garcia-Ortiz JE, Uda M, Criponi L, Forabosco A, Pilia G, Schlessinger D. 2005. Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Hum Mol Genet* 14:2053-2062.
- Pandian TJ & Koteeswaran. 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* 384:167-243.
- Pandit NP, Bhandari RK, Kobayashi Y, Nakamura M. 2015. High temperature-induced sterility in the female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Gen Comp Endocrinol* 213:110-117.
- Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, Guerra L, Schedl A, Camerino G. 2006. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 38:1304-1309.
- Paul-Prasanth B, Bhandari RK, Kobayashi T, Horiguchi R, Kobayashi Y, Nakamoto M, Shibata Y, Sakai F, Nakamura M, Nagahama Y. 2013. Estrogen oversees the maintenance of the female genetic program in terminally differentiated gonochorists. *Sci Rep* 3:2862.

- Pfenning F, Kurth T, Meibner S, Standke A, Hoppe M, Zieschang CR, Göbel A, Kretzschmar G, Gutzeit HO. 2011. The social status of the male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) influences testis structure and gene expression. *Reproduction* 143:1-15.
- Pfenning F, Standke A, Gutzeit, HO. 2015. The role of Amh signaling in teleost fish - multiple functions not restricted to the gonads. *Gen Comp Endocrinol* 223:87-107.
- Pieau C, Dorizzi M, Richard-Mercier N. 1999. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cell Mol Life Sci* 55:887-900.
- Piferrer F, Beaumont A, Falguière JC, Flajšhans M, Haffray P, Colombo L. 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293:125-156.
- Piprek RP, Pecio A, Kubiak JZ, Szymura JM. 2012. Differential effects of busulfan on gonadal development in five divergent anuran species. *Rep Tox* 34:393-401.
- Poonlaphdecha S, Pepey E, Huang SH, Canonne M, Soler L, Mortaji S, Morand S, Pfennig F, Mélard C, Baroiller JF, D'Cotta H. 2011. Elevated *amh* gene expression in brains of male tilapias (*Oreochromis niloticus*) during testis differentiation. *Sex Dev* 5:33-47.
- Poonlaphdecha S, Pepey E, Canonne M, de Verdal H, Baroiller JF, D'Cotta H. 2013. Temperature induced-masulinisation in the Nile tilapia causes up-regulation of both *dmrt1* and *amh* expressions. *Gen Com Endocrinol* 193:234-42.
- Pradeep PJ, Sriyaya TC, Shahreeza MS, Mithun S, Anuar H, Anil A. 2010. Induction of triploidy in red tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) x *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) by heat shock treatment under laboratory conditions. *J Coast Envir* 1(1):91-102
- Pradeep PJ, Sriyaya TC, Papini A, Chatterji A. 2012. Effects of triploidy induction on growth and masculinization of red tilapia [*Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) x *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)]. *Aquaculture* 344-349:181-187.
- Prueitt RL & Zinn AR. 2001. A fork in the road to fertility. *Nat Genet* 27:132-134.
- Razak SA, Hwang GL, Rahman MA, Maclean N. 1999. Growth performance and gonadal development of growth enhanced transgenic tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) following heat-shock-induced triploidy. *Mar Biotechnol* 1:533-544.
- Rashid H, Kitano H, Hoon Lee K, Nii S, Shigematsu T, Kadomura K, Yamaguchi A, Matsuyama M. 2007. Fugu (*Takifugurubripes*) sexual differentiation: CYP19 regulation and aromatase inhibitor induced testicular development. *Sex Dev* 1:311-322.
- Raymond CS, Parker ED, Kettlewell JR, Brown LG, Page DC, Kusz K, Jaruzelska J, Reinberg Y, Flejter WL, Bardwell VJ, Hirsch B, Zarkower D. 1999. A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum Mol Genet* 8:989-996.

- Richardson BE & Lehmann R. 2010. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: Strategies from different organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:37–49.
- Rivera-Pérez JA, Magnuson T. 2005. Primitive streak formation in mice is preceded by localized activation of Brachyury and Wnt3. *Dev. Biol.* 288:363-371.
- Rockett JC, Mapp FL, Garges JB, Luft JC, Mori C, Dix DJ. 2001. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biol Reprod* 65:229-239.
- Rodríguez-Marí A, Yan YL, Bremiller RA, Wilson C, Cañestro C, Postlethwait JH. 2005. Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone (*amh*) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development. *Gene Expr Patterns* 5:655-667.
- Rougeot C, Krim A, Mandiki SN, Kestemont P, Mélard C. 2007. Sex steroid dynamics during embryogenesis and sexual differentiation in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Theriogenology* 67:1046-52.
- Rougeot C, Prignon C, Ngouana-Kengne CV, Mélard C. 2008. Effect of high temperature during embryogenesis on the sex differentiation process in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 276:205-208.
- Saffman EE & Lasko F. 1999. Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cell Mol Life Sci* 55:1141-1163.
- Saito T, Fujimoto T, Maegawa S, Inoue K, Tanaka M, Arai K, Yamaha E. 2006. Visualization of primordial germ cells in vivo using FP-nos1 3'UTR mRNA. *Int J Dev Biol* 50:691-9.
- Saito D, Morinaga C, Aoki Y, Nakamura S, Mitani H, Furutani-Seiki M, Kondoh H, Tanaka M. 2007. Proliferation of germ cells during gonadal sex differentiation in medaka: Insights from germ cell-depleted mutant zenzai. *Dev Biol* 310:280-290.
- Salem M, Kenney PB, Rexroad III CE, Yao J. 2006. Molecular characterization of muscle atrophy and proteolysis associated with spawning in rainbow trout. *Comp Biochem Physiol Part D Genom Proteom* 1:227-237.
- Schulz RW & Miura T. 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol Biochem* 26:43-56.
- Schulz RW, Menting S, Bogerd J, França LR, Vilela DAR, Godinho HP. 2005. Sertoli cell proliferation in the adult testis - evidence from two species belonging to different orders. *Biol Reprod* 73:891-898.
- Schulz RW, Bogerd J, Male R, Ball J, Fenske M, Olsen LC, Tyler CR. 2007. Estrogen induced alterations in *amh* and *dmrt1* expression signal for disruption in male sexual development in the zebrafish. *Environ Sci Technol* 41:6305-6310.
- Schulz RW, de França LR, Lareyre JJ, LeGac F, Chiarini-Garcia H, Nobrega RH, Miura T. 2010. Spermatogenesis in fish. *GCE* 165:390-411

- Schutt C & Nothinger R. 2000. Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. *Development* 127:667-677.
- Scott AG, Penman DJ, Beardmore JA, Skibinski DOF. 1989. The 'YY' supermale in *Oreochromis niloticus* (L.) and its potential in aquaculture. *Aquaculture* 78: 237-251.
- Setchell BP. 1986. The movement of fluids and substances in the testis. *Aust. J. Biol. Sci.* 39, 193–207.
- Shimizu T, Ohshima I, Ozawa M, Takahashi S, Tajima A, Shiota M, Miyazaki H, Kanai Y. 2005. Heat stress diminishes gonadotropin receptor expression and enhances susceptibility to apoptosis of rat granulosa cells. *Reproduction* 129:463-472.
- Shiraishi E, Yoshinaga N, Miura T, Yokoi H, Wakamatsu Y, Abe S, Kitano T. 2008. Mullerian inhibiting substance is required for germ cell proliferation during early gonadal differentiation in medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology* 149(4):1813-9.
- Shoemaker CM, Queen J, Crews D. 2007b. Response of candidate sex-determining genes to changes in temperature reveals their involvement in the molecular network underlying temperature-dependent sex determination. *Mol Endocrinol* 21:2750-2763.
- Shoemaker CM & Crews D. 2009. Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Semin Cell Dev Biol* 20:293-303.
- Siegfried KR & Nusslein-Volhard C. 2008. Germ line control of female sex determination in zebrafish. *Developmental Biology* 324:277-287.
- Skarr KS, Nobrega RH, Magaraki A, Olsen LC, Sculz RW, Male R. 2011. Proteolytically activated, recombinant anti-mullerian hormone inhibits androgen secretion, proliferation, and differentiation of spermatogonia in adult zebrafish testis organ cultures. *Endocrinology* 152(9):3527-40.
- Slanchev K, Stebler J, de la Cueva-Mendez G, Raz E. 2005. Development without germ cells: the role of the germ line in zebrafish sex differentiation. *Proc Natl Acad Sci States USA* 102:4074-4079.
- Speed RM. 1982. Meiosis in the foetal mouse ovary. An analysis at the light microscope level using surface-spreading. *Chromosoma* 85:427-437.
- Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP. 1994. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* 372:679-683.
- Strüssmann CA, Saito T, Usui M, Yamada H, Yamashita F. 1997. Thermal thresholds and critical period of thermolabile sex determination in two atherinid fishes, *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. *J Exp Zool* 278:167-177.
- Strüssmann CA, Saito T, Takashima F. 1998. Heat induced germ cell deficiency in the teleosts *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. *Comp Biochem Physiol* 119A:637-44.

- Sun LN, Jiang XL, Xie QP, Yuan J, Huang BF, Tao WJ, Zhou LY, Nagahama Y, Wang DS. 2014. Transdifferentiation of differentiated ovary into functional testis by long-term treatment of aromatase inhibitor in Nile tilapia. *Endocrinology* 155:1476-1488.
- Tacon P, Baroiller JF, Le Bail PY, Prunet P, Jalabert B. 2000. Effect of egg deprivation on sex steroids, gonadotropin, prolactin, and growth hormone profiles during the reproductive cycle of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *Gen Comp Endocrinol* 117:54-65.
- Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. 2003. Generation of live fry from intraperitoneally primordial germ cells in rainbow trout. *Biol Reprod* 69: 1142- 1149.
- Tanaka M, Kinoshita M, Kobayashi D, Nagahama Y. 2001. Establishment of medaka (*Oryzias latipes*) transgenic lines with the expression of green fluorescent protein fluorescence exclusively in germ cells: a useful model to monitor germ cells in a live vertebrate. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2544-9.
- Tanaka M, Saito D, Morinaga C, Kurokawa H. 2008. Cross talk between germ cells and gonadal somatic cells is critical for sex differentiation of the gonads in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Dev Growth Differ* 50:273-8.
- Tessema M, Müller-Belecke A, Hörstgen-Schwark G. 2006. Effect of rearing temperatures on the sex ratio of *Oreochromis niloticus* populations. *Aquaculture* 258:270-277.
- Thorstad EB, Fleming IA, McGinnity P, Soto D, Wennevik V, Whoriskey F. 2008. Incidence and impacts of escaped farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in nature. NINA Special Report 36. 110 pp.
- Thys van den Audenaerde DFE. 1968. An annotated bibliography of Tilapia (Pisces: Cichlidae). *Mus R Afr Cent Doc Zool* 14:406.
- Toyooka Y, Tsunekawa N, Takahashi Y, Matsui Y, Satoh M, Noce T. 2000. Expression and intracellular localization of mouse VASA-homologue protein during germ cell development. *Mech Develop* 93:139-149.
- Tsunekawa N, Naito M, Sakai Y, Nishida T, Noce T. 2000. Isolation of Chicken *vasa* homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* 127:2741-2750.
- Tzchori I, Zak T, Sachs O. 2004. Masculinization of genetic females of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) by dietary administration of an aromatase inhibitor, *Isr. J Aquacult Bamid* 56:239-246.
- Uchida D, Yamashita M, Kitano T, Iguchi T. 2002. Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *J Exp Biol* 205:711-718.
- Uchida D, Yamashita M, Kitano T, Iguchi T. 2004. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comp Biochem Physiol A* 137:11-20.

- Udoh P & Kehinde A. 1999. Studies on antifertility effect of pawpaw seeds (*Carica papaya*) on the gonads of male albino rats. *Phytother Res* 13:226-228.
- Vainio S, Heikkilä M, Kispert A *et al.* 1999. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397:405-409.
- Vera-Cruz EMV & Mair GC. 1994. Conditions for effective androgen sex-reversal in *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 122:237-248.
- Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG, Schedl A. 2001. *Sox9* induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet* 28:216-217.
- Vizziano D, Randuineau G, Baron D, Cauty C, Guiguen Y. 2007. Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Dyn* 236:2198-2206.
- Von Hofsten J, Larsson A, Olsson PE. 2005. Novel steroidogenic factor-1 homolog (ff1d) is coexpressed with anti-Müllerian hormone (AMH) in Zebrafish. *Dev Dyn* 233:595-604.
- Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G. 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79:1111-1120.
- Wang D, Kobayashi T, Zhou L, Nagahama Y. 2004. Molecular cloning and gene expression of Foxl2 in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biochem Biophys Res Commun* 320:83-9.
- Wang D, Kobayashi T, Zhou L, Paul-Prasanth B, Ijiri S, Sakai F, Okubo K, Morohashi K, Nagahama Y. 2007. *Foxl2* up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with Ad4BP/SF-1. *Mol Endocrinol* 21:712-725.
- Wang DS, Zhou LY, Kobayashi T, Matsuda M, Shibata Y, Sakai F, Nagahama Y. 2010. Doublesex- and Mab-3-related transcription factor-1 repression of aromatase transcription, a possible mechanism favoring the male pathway in tilapia. *Endocrinology* 151:1331-40.
- Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. 2007. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev* 81:1-28.
- Wilson CA, McCluskey BM, Amores A, Yan YI, Titus TA, Anderson JL, Batzel P, Carvan MJ, Schartl M, Postlethwait JH. 2014. Wild Sex in Zebrafish: Loss of the Natural Sex Determinant in Domesticated Strains. *Genetics* 198 (3):1291-1308.
- Wylie C. 1999. Germ cells. *Cell* 96:165-174.
- Yamaguchi T, Yamaguchi S, Hirai T, Kitano T. 2007. Follicle-stimulating hormone signaling and *Foxl2* are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochem Biophys Res Commun* 359:935-940.

- Yamamoto Y, Hattori RS, Kitahara A, Kimura H, Yamashita M, Strüssmann CA. 2013. Thermal and endocrine regulation of gonadal apoptosis during sex differentiation in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Sex Dev* 7:316-324.
- Yano A, Guyomard R, Nicol B, Jouanno E, Quillet E, Klopp C, Cabau C, Bouchez O, Fostier A, Guiguen Y. 2012. An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Curr Biol* 22(15):1423-8.
- Yano A, Nicol B, Jouanno E, Quillet E, Fostier A, Guyomard R, Guiguen Y. 2013. The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evol Appl* 6:b486-96.
- Yao HC & Capel B. 2005. Temperature, genes, and sex: a comparative view of sex determination in *Trachemys scripta* and *Mus musculus*. *J Biochem* 138:5-12.
- Yin Y, Hawkins KL, DeWolf WC, Morgentaler A. 1997. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl* 18:159-165.
- Ying Y, Qi X, Zhao GQ. 2001 Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7858-7862.
- Ying Y, Zhao G-Q. 2001 Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol* 232:484-492.
- Yokoi H, Kobayashi T, Tanaka M, Nagahama Y, Wakamatsu Y, Takeda H, Araki K, Morohashi K, Ozato K. 2002. *Sox9* in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): evidence for diversified function of *Sox9* in gonad differentiation. *Mol Reprod Dev* 63:5-16.
- Yoon C, Kawakami K, Hopkins N. 1997. Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development* 124:3157-3166.
- Yoshikawa H et Oguri M. 1978a. Effects of steroid hormones on the sex differentiation in a Cichlid fish, *Tilapia zillii*. *Bull Jap Soc sci Fish* 44:1093-1097.
- Yoshikawa H & Oguri M. 1978 b. Sex differentiation in a Cichlid, *Tilapia zillii*. *Bull Jap Soc Sci Fish* 44:313-318.
- Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2469-74.
- Yoshizaki G, Sakatani S, Tominaga H, Takeuchi T. 2000. Cloning and characterization of a vasa-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Mol Reprod Dev* 55:364-371.
- Youngren KK, Coveney D, Peng X, Bhattacharya C, Schmidt LS, Nickerson ML, Lamb BT, Deng JM, Behringer RR, Capel B, Rubin EM, Nadeau JH, Matin A. 2005. The Ter mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours. *Nature* 435:360-364.

Wessels S, Hörstgen-Schwark G. 2007. Selection experiments to increase the proportion of males in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by means of temperature treatment. *Aquaculture* 272:S80-S87.

Wessels S & Hörstgen-Schwark G. 2011. Temperature dependent sex ratios in selected lines and crosses with a YY-male in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 318:79-84.

Articles de périodiques électroniques

Baroiller JF & Toguyeni A. 2004. The Tilapiini tribe: environmental and social aspects of reproduction and growth. In Fisheries and Aquaculture, [Ed. Patrick Safran], in *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford,UK, Vol. III, pp. 230-256. <http://www.eolss.net>

Günesdogan U, Magnusdottir E, Surani MA. 2014. Primordial germ cell specification: a context-dependent cellular differentiation event. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369: 20130543. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0543>

Kavembe G, Machado-Schiaffini G, Meyer A. AUGUST 2013. Pronounced genetic differentiation of small, isolated and fragmented tilapia populations inhabiting the Magadi Soda Lake in Kenya. *Hydrobiologia* DOI: 10.1007/s10750-013-1648-9

Linhartová Z, Saito T, Kašpar V, Rodina M, Prášková E, Hagihara S, Pšenička M. 2015. Sterilization of sterlet *Acipenser ruthenus* by using knock down agent, antisense morpholino oligonucleotide, against dead end gene1. *Theriogenology* doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.003.

Majhi SK, Hattori RS, Yokota M *et al.* 2009b. Germ cell transplantation using sexually competent fish: an approach for rapid propagation of endangered and valuable germ lines. *PLoS One* 4:e6132

Nakamura M, Nagahama Y. 1995. Innervation of testes in the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 135:41-9. doi:10.1016/00448486(95)01006-8.

Palaiokostas C, Bekaert M, Khan MG, Taggart JB, Gharbi K, McAndrew Bj, Penman DJ. 2013. Mapping and validation of the major sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Using RAD sequencing. *PLoS One*. 2013 Jul 11;8(7):e68389. doi: 10.1371/journal.pone.0068389.

Raz E. The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development. *Genome Biology* review 1017.1-1017.6. Published online 2000 Sep 1, doi: [10.1186/gb-2000-1-3-reviews1017](https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-3-reviews1017)

Rodriguez-Mari A, Canestro C, BreMiller RA, Nguyen-Johnson A, Asakawa K, Kawakami K, Postlethwait JH. 2010. Sex reversal in zebrafish fancl mutants is caused by Tp53-mediated germ cell apoptosis. *PloS Genet* 6(7):e1001034. Published online 2010 Jul 22. doi: [10.1371/journal.pgen.1001034](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001034)

- Uribe MC, Grier HJ, Mejía-Roa V. 2014. Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. *Spermatogenesis* 4:3, e983400, DOI:10.4161/21565562.2014.983400.
- Xu HY, Li MY, Gui JF, *et al.* 2010. Fish germ cells. *Sci China Life Sci* 53: 435–446. doi:10.1007/s11427-010-0058-8.
- Wong TT, Zohar Y. 2015. Production of reproductively sterile fish: A mini-review of germ cell elimination technologies. *Gen Comp Endocrinol* 2015 Jan 9. pii: S0016-6480(14)00475-4. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.12.012.

Chapitre dans un ouvrage imprimé

- Danoune JP & Demoulin A. Structure et fonctions du testicule. In : coordonnateurs Thibault C & Levasseur MC. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Ed Ellipses, INRA, 2001.
- Fitzsimmons K. 2000. Prospect and potential for global production. In: Lim CE, Webster CD, eds. *Tilapia : biology, culture, and nutrition*. Binghamton (NY, USA): Food Products Press (The Haworth Press).
- Hunter GA & Donaldson EM. 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: Fish Physiology W.S. Hoar, D.J. Randall & E.M. Donaldson, Editors, *Behaviour and Fertility Control Vol. IX B*, Academic Press, New York. 223-303.
- Pandit NP, Shrestha MK and Nakamura M. 2012. Heat-induced germ cell loss in sub-adult Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. In: Liping I & Fitzsimmons, eds. Better science, better fish, better life proceedings of the ninth international symposium on tilapia in aquaculture (Shanghai, China).
- Robel P. La stéroïdogénèse : les enzymes et la régulation de leur expression génomique. p.150. In : coordonnateurs Thibault C & Levasseur MC. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Ed Ellipses, INRA, 2001.
- Sheynkin Y, Jung M, Yoo P, Schulsinger D, Komaroff E. Increase in scrotal temperature in lap top computer users. *Human Reproduction Vol 20 N°2*.2005, pp 452-455.
- Strüssmann CA & Patino R. Sex determination, environmental. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction*, V4. San Diego: Academic Pressn,1999, p. 402–9.
- Yamamoto T. Sex differentiation. *In Fish physiology, Vol III*.1969.

Communication dans un congrès

- Altena A & Hörstgen-Schwark G. 2002. Effects of rearing temperatures on sex ratios in tilapia, *Oreochromis niloticus* L., investigations on a local population from the Lake Victoria in Kenya. Challenge to Organic Farming and Sustainable Land Use in the Tropics and Subtropics. Deutscher Tropentag, October 9-11, 2002, Witzenhausen.

- Baroiller JF, Clota F & Geraz E. 1995b. Temperature sex determination in two tilapias species *Oreochromis niloticus* and the red tilapia (Red Florida strain): effect of high or low temperatures. In: Goetz FW, Thomas P, editors. Proceedings of the 5th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. The University of Texas, Austin, Texas, USA. 158-160.
- Baroiller JF & Togueni A. 1996. Comparative effects of a natural androgen, 11 β -hydroxyandrostenedione, and a synthetic androgen, 17 α -methyltestosterone, on the sex-ratios of *Oreochromis niloticus*. In Proceedings of the 3rd International Symposium on Tilapia in Aquaculture (ISTA). Abidjan, Côte d'Ivoire, RSV Pullin, J Lazard, M Legendre, JB Amon Kothias & D Pauly (eds.), ICLARM Conf Proc, p.238-245.
- Bentsen HB & Thodesen J. 2008. Genetic interactions between farmed and wild fish, with examples from the atlantic salmon case in Norway. In : Gjedrem T, ed. Selection and breeding programs in aquaculture. Dordrecht (Pays-Bas) : Springer.
- Chourrout D & Itskovich J. 1983. Three manipulations permitted by artificial insemination in tilapia: induced diploid gynogenesis, production of all triploid populations and intergeneric hybridization. In: Fishelson L & Yaron Z (Eds), Proceedings of the Int Symp on Tilapia Aquaculture. Tel Aviv University, Tel Aviv, Israël, p 246-255.
- D'Cotta H, Pepey E, Pfenning F, Bienvenu D, Gutzeit HO, Volff JN, Wenning M, Baroiller JF. 2007. *Sox9a*, *sox9b* and *amh* are up-regulated in the gonads during natural and temperature-induced tilapia male differentiation. In: Proceedings of the 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Saint-Malo, France.
- Dunham RA, Majumdar K, Hallerman E, Bartley D, Mair G, Hulata G, Liu Z, Pongthana N, Bakos J, Penman D, Gupta M, Rothlisberg P, Hörstgen-Schwark G. 2000. Report of the Conference on Aquaculture in the 3rd Millennium. 20-25 February 2000, Bangkok, Thailand. NACA, Bangkok and FAO, Rome. 120pp. 137-165.
- Ekanemm SB & Okoronkwo TE. 2003. Pawpaw seed as fertility control agent on male Nile tilapia. NAGA, WorldFish Center Quarterly Vol 26, No 2.
- Nakamura M, Nozu R, Sato K, Kobayashi T. 2013. Sterilization of male tilapia by high temperature. Proceedings of the 17th International Symposium of ICCE, Barcelona, Spain.
- Penman DJ, Shibinski DOF, Beardmore JA. 1987. Survival growth rate and maturity in triploid tilapia. In: Tiews K (Ed) Hybridisation and Genetic Engineering in Aquaculture, Vol II: Proc World Symp on Selection. Heenemann, Berlin p 277-288.

Ouvrages imprimés

Nelson JS. *Fishes of the World, 4th edition*. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, 2006.

Pillay TVR. *Aquaculture: Principles and Practices*. Oxford, UK: Fishing News Books, Blackwell Science, 1990, 575 p.

Smith A. *Illustration of the Zoology of South Africa, vol.4*. London: Pisces, Smith, Elder, 1840, 5 p.

Trewavas, E. Tialpine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. British Museum (Natural History), London, 1983, 563 p.

Ouvrages électroniques

Tomy S & Poniah AG. *Sterility and its implication in tilapia aquaculture: a review*. Chennai-28, India: CIBA ePublication Series N°28, 2014. <http://www.ciba.res.in/Books/epublicationno28.pdf>

Sites web consultés

Fages D et Gueuné ML. 2005. <http://espace-svt.ac-rennes.fr/applic/ovaire/ovaire.htm>.

FAO. 2013. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/fr. Statistiques de production

ONU. 13 juin 2013. <http://www.un.org/fr/development/desa/news/population/un-report-world-population-projected-to-reach-9-6-billion-by-2050.html>.

Travaux universitaires

BAROILLER JF. *Etude corrélée de l'apparition des critères morphologiques de la différenciation de la gonade et de ses potentialités stéroïdogènes chez Oreochromis niloticus*. Thèse Doc, UnivP et M Curie, Paris VI, 1988, 89 p.

FABIOUX C. 2004. Origine et développement des cellules germinales chez l'huître *Crassostrea gigas*: intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosérie. Reproductive Biology. Université de Bretagne occidentale - Brest. French. <tel-00009344>.

PRADEEP PJ. *Production of triploidy in red tilapia [Oreochromis mossambicus (Peters, 1852) × Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758)]*. PhD Thesis. University Malaysia Terengganu, 2011, 306p.

Liste des tableaux

Tableau 1. Tableau synthétique des différents traitements d'induction de la triploïdie chez le tilapia du Nil et le tilapia rouge (Modifié de Hussain <i>et al.</i> , 1991 ; Pradeep <i>et al.</i> , 2010, 2011).....	77
Tableau 2. Résumé des approches de stérilisation utilisées ou pouvant être utilisées en pisciculture (d'après Pandian et Koteeswaran 1998 ; Devlin et Nagahama 2002 ; Linhart <i>et al.</i> , 2006 ; Maxime 2008 ; Piferrer <i>et al.</i> , 2009 ; Ekanemm et Okoronkwo, 2003 ; Abbas et Abbas, 2011).	79
Tableau 3. Amorces utilisées pour la PCR en temps réel.	94
Tableau 4 représentant le diamètre cellulaire moyen des ovocytes en différenciation dans un ovaire mature de tilapia du Nil.	103
Tableau 5. Sexages des descendance monosexes femelles (XX).	119
Tableau 6. Sexage des descendance mâles et mixtes.	163
Tableau 7. Récapitulatif des différentes descendance traitées au busulfan et leur sexe génétique : mixte (XX/XY), monosex femelle (XX) ou monosex mâle (XY) ; le mode d'administration du busulfan et sa dose : par injection à 40 mg de busulfan/kg de poids vif ou incorporé dans l'aliment aux doses de 40, 80 et 160 mg de busulfan/kg d'aliment. Une injection unique a eu lieu à l'âge de 55 dpf chez la descendance XX/XY. L'aliment contenant le busulfan a été administré à des descendance monosexes femelles (XX) ou monosexes mâles (XY) à partir de l'âge de 10 dpf (stade alevin) pendant 2 mois (60 jours de traitement).....	181
Tableau 8. Présentation des différentes dates de prélèvement des groupes d'individus Placebos et BfI40 de la descendance mixte OnB XX(XY ou YY)A. 3 prélèvements ont été effectués : les 2 premiers à 1 (J29) et 2 mois (J30) après l'injection et le dernier au moment du sexage, soit environ 8 mois après l'injection de busulfan. A chaque date de prélèvement, les gonades et les cerveaux ont été fixés dans du Bouin ou du PFA 4% pour les analyses histologiques, dans de l'éthanol absolu pour de futures analyses génomiques ou du RNA later pour les analyses expressionnelles.....	183
Tableau 9. Récapitulatif des diverses données du sexage de la descendance mixte OnB XX/XY-A 8 mois après l'injection : 2 groupes Placebo et traité BfI40, phénotype gonadique ou sex-ratio ainsi que le pourcentage pour chacun des 2 groupes, le RGS de chaque phénotype gonadique et le pourcentage (%) de survie de chacun des groupes.	184

Tableau 10. Récapitulatif des diverses données du sexage des 5 descendance utilisées pour la série d'expérimentation 2, à savoir l'incorporation du busulfan dans l'aliment à 3 doses différentes : 40, 80 et 160 mg de busulfan/kg d'aliment. Chaque descendance a été divisée en 2 groupes : 27°C, le lot ayant reçu l'aliment classique et Bf suivi du chiffre de la dose de busulfan (40,80 ou 160) pour le lot ayant reçu le traitement durant 60 jours. Pour chacun des groupes, 27°C et Bf, les sex-ratios, RGS et pourcentages (%) de survie sont donnés. 188

Liste des figures

- Figure 1. Coupe histologique d'un testicule adulte de mammifère montrant des sections de tubes séminifères entourées d'espace interstitiel occupé par des amas de cellules de *Leydig* (x 1700) (d'après Danoune et Demoulin, 2001). 25
- Figure 2. Coupe histologique d'un ovaire de lapine montrant des follicules à différents stades d'évolution et des vaisseaux sanguins. Observation à la loupe (x7) (d'après Fages et Gueuné, 2005). 25
- Figure 3. La différenciation gonadique chez le tilapia du Nil. A: gonade indifférenciée à 3dah. CE, épithélium cœlomique ; GSc, cellule entourant les cellules germinales. B-E,I: gonades XY. F-H: gonades XX. Les lignes pointillées représentent les cellules germinales goniales ; S, masse de cellules médullaires ; BV, vaisseaux sanguins ; FOC, formation de la cavité ovarienne ; FED, formation du canal efférent ; Goc, ovocyte en croissance ; Oc, cavité ovarienne ; ED, canal efférent ; In, Interstitium. (d'après Kobayashi *et al.*, 2008). A,I: les cellules germinales sont marquées avec un anticorps anti-vasa (d'après Kobayashi *et al.*, 2002). Echelle 20µm pour A-H et 30µm pour I..... 28
- Figure 4. Dimorphisme sexuel durant la différenciation gonadique chez le tilapia du Nil. Schéma de l'histogenèse gonadique pendant la différenciation du sexe. CE, épithélium cœlomique ; GGC, cellules germinales goniales ; SPC, cellules stéroïdogéniques ; BV, vaisseaux sanguins ; OvC, cavité ovarienne ; pED, ébauche du canal efférent ; Oc, ovocyte ; ED, canal efférent intra-testiculaire ; M, cellules médullaires ; I, interstitium ; dah, days after hatching (d'après Kobayashi, 2010). 28
- Figure 5. Relations antagonistes entre les cascades déterminant le développement des testicules ou des ovaires chez les mammifères. La cascade mâle est représentée à gauche et la femelle à droite (d'après Graves et Peichel, 2010). 29
- Figure 6. Représentation schématique des évènements génétiques qui ont lieu lors de la détermination et la différenciation gonadique chez les mammifères GDS. Les lignes continues représentent les relations de régulation directe alors que les lignes discontinues montrent les relations indirectes (modifié d'après Shoemaker et Crews 2009). 33
- Figure 7. Formation des CGPs à partir de quelques cellules situées dans la partie postérieure de l'épiblaste qui est en contact avec l'ectoderme extra-embryonnaire. Modèle d'induction de la spécification des CGPs par 2 voies de signalisation cellulaire : BMPs et WNT3/β-CATENIN, chez la souris (d'après Günesdogan *et al.*, 2014). 41

Figure 8. Modèle de spécification des CGP par localisation des déterminants d'origine maternelle (ARNm/protéines) contenus dans le cytoplasme de l'embryon, chez des organismes tel que le poisson-zèbre. CGPs : cellules germinales primordiales (modifié d'après Fabioux, 2004).....	42
Figure 9. Représentation schématique des voies de synthèse des androgènes et des œstrogènes dans les gonades mâles et femelles des poissons téléostéens (d'après Baroiller <i>et al.</i> , 1999 ; Govoroun <i>et al.</i> , 2001).	51
Figure 10. La stéroïdogénèse dans l'ovaire de mammifères (d'après Robel, 2001).	52
Figure 11. Les niveaux d'œstrogènes sont responsables du développement gonadique mâle ou femelle (modifié de Guiguen <i>et al.</i> , 2009).	55
Figure 12. Chez les espèces thermosensibles et/ou à déterminisme TSD (Temperature Sex Determination), les niveaux d'aromatase gonadique sont également régulés par la température durant la période critique (d'après D'Cotta <i>et al.</i> , 2001a).....	58
Figure 13. Production d'individus triploïdes 3n (d'après Piferrer <i>et al.</i> , 2009).	59
Figure 14. Schéma des migrations du tilapia du Nil, durant son cycle de vie (d'après Bezault <i>et al.</i> , 2007).	67
Figure 16. Aire de répartition naturelle du tilapia du Nil, <i>O. niloticus</i> (en gris), avec les localisations d'échantillonnage de 6 populations sauvages investiguées pour tester leur détermination sexuelle : les lacs Manzala (Egypte), Rudolph (Kenya), Volta (Ghana), Koka & Metahara (Ethiopie). Les symboles correspondent aux références suivantes : ★Altena et Hörstgen-Schwark, 2002 ; ● Tessema <i>et al.</i> , 2006 ; ■ Bezault <i>et al.</i> , 2007.	68
Figure 15. Effets parentaux sur la thermosensibilité d' <i>O. niloticus</i> , montrés par un schéma diallèle impliquant le croisement de 5 femelles (A à E) par 5 mâles (1 à 5). Chaque descendance est divisée en deux groupes, respectivement élevés à la température optimale de 27°C (contrôle) et 36°C (température masculinisante). La figure représente l'écart de sexe ratio (% de gain de mâles à 36°C par rapport à la proportion de mâle à 27°C). * différences significatives (d'après Baroiller et D'Cotta, 2001).	68
Figure 17. Production du tilapia du Nil, <i>Oreochromis niloticus</i> , en million de tonnes, de 2003 à 2013 (source : FAO, 2013).	71
Figure 18. Différences de croissance entre les mâles (à gauche) et les femelles (à droite) d'une même descendance de tilapia du Nil, <i>O. niloticus</i>	72
Figure 19. Schéma représentant la complexité du déterminisme du sexe chez le tilapia, et montrant les 3 facteurs influençant le sexe : le(s) déterminant(s) majeur(s)porté(s) par les	

chromosomes sexuels XX/XY, les facteurs génétiques mineurs apportés par les 2 parents, et la température (d'après Baroiller <i>et al.</i> , 2009a,b).....	73
Figure 20. Les fortes températures régulent également l'expression de nombreux gènes, avec notamment, une stimulation des gènes connus pour être impliqués dans la différenciation testiculaire (<i>Dmrt1</i> , <i>Amh</i>), et une inhibition des gènes de la voie de différenciation ovarienne (<i>Foxl2</i> , <i>cyp19a1</i>) (modifié d'après D'Cotta <i>et al.</i> , 2001; Baroiller <i>et al.</i> , 2009 ; Poonlaphdecha <i>et al.</i> , 2012).	75
Figure 21. Représentation schématique du patron d'expression des gènes impliqués dans la voie de différenciation sexuelle, présents dans les gonades de tilapias mâles XY (rectangle bleu), femelles masculinisées par la température (XX-TM - rectangle vert) et femelles XX (rectangle rose). L'échelle est représentée en "days post-fertilization" (dpf). Les cercles blancs représentent les gènes du développement ovarien (<i>cyp19a1a</i> , <i>foxl2</i>) tandis que les cercles noirs représentent les gènes du développement testiculaire (<i>amhc</i> , <i>amhg</i> , <i>dmrt1</i> , <i>sox9s</i>) (d'après D'Cotta <i>et al.</i> , 2001 ; Wang <i>et al.</i> , 2007, 2010 ; Baroiller <i>et al.</i> , 2009a ; Poonlaphdecha <i>et al.</i> , 2011, 2013).	76
Figure 22. Production des monosexes femelles (XX) utilisées pour l'article 1 et le chapitre 3 des résultats.	89
Figure 23. Production des descendance monosexes mâles (XY) utilisées pour l'article 2 et chapitre 3 des résultats. G : génération.	90
Figure 24. Structure ovarienne lors de la maturation sexuelle de femelle tilapia du Nil.	101
Figure 25. Coupe ovarienne montrant les cellules germinales femelles à différents stades de différenciation. Oo: ovogonies, OvI: ovocyte I, PN1: ovocytes péri-nucléaires 1, PN2 : ovocytes péri-nucléaires 2, PVF: ovocytes prévitellogéniques et VF: ovocytes vitellogéniques.	103
Figure 26. Coupe ovarienne présentant un follicule atrétique (AT).	103
Figure 27. Coupe ovarienne montrant des cellules somatiques folliculaires de la granulosa (Gr).....	104
Figure 28. Diagramme schématique représentant les expérimentations aux fortes températures de 37°C sur des femelles génétiques XX tilapias du Nil alevins et juvéniles. DT : jour de prélèvement, ET: fin du traitement, MAT: mois après la fin du traitement, S: sexage.	110
Figure 29. Etude de l'effet des traitements stérilisants de 37°C sur les gonades des femelles génétiques XX alevins et juvéniles de tilapias du Nil à différents niveaux et comparaisons des groupes traités XX-37°C avec les groupes témoins XX-27°C	111

Figure 30. Représentation schématique de notre hypothèse qui serait que les effets masculinisants des fortes températures pourraient être dûs à la baisse du nombre de cellules germinales par apoptose et que les très hautes températures pourraient promouvoir une stérilisation gonadique avec la mort de toutes les cellules germinales.

..... 111

Figure 31. Gonad morphologies of Nile tilapia XX females at the time of sexing (4 months after the end of the 37°C treatment of fry), of the 27°C controls showing different stages of oogenesis: A previtellogenic 1 (PV1), B previtellogenic 2 (PV2) and C vitellogenic oocytes. Types of sterilised gonads observed in the 37°C-treated fish: D string-like (STL) E-F translucent (TSL) and G partially sterile (PSG) gonads. A white arrow shows oocytes and dotted orange arrows show translucent areas. 119

Figure 32. Histological sections of female gonads at the time of sexing (four months after the end of the treatment) of 27°C controls and 37°C-treated fry for 60 days stained with Hematoxylin/Eosin (HE). A: a 27°C control ovary showing different stages of oocytes: primary oocytes (Oo), primary perinuclear oocytes (PN1), secondary perinuclear oocytes (PN2), previtellogenic oocytes (PVF) and vitellogenic oocytes (V). B: Amplification of (A) box, showing the somatic theca cells (Th) and granulosa cells (Gr). C: sterile string-like gonad (SG-STL) devoid of oocytes, with the ovigerous lamellae (Lam) composed of some steroid producing cells (SPC) and erythrocytes (E). D: Amplification of (C). E: sterile string-like gonad exhibiting a masculinisation with testicular cordon-like organization resembling efferent-like ducts and presence of a few spermatids in the lumen (LC). F: Amplification of (E) showing Leydig-like cells G: sterile translucent gonad (SG-TSL) with absence of germ cells where the ovarian cavity, the ovarian lamellae and steroid producing cells are observed. H: Amplification of (G). I: Transversal section of SG-TSL. 121

Figure 33. A-C Histological sections stained with Hematoxylin/Eosin (HE) of partially sterile gonads (PSG) from the 37°C fry-treated group. A: Sterile region of a PSG fry-37°C treated female absent of germ cells showing a testes-like configuration with disorganised cysts (asterik) and Leydig-like cells (LC). B: Amplification of A. C: Ovarian section of a PSG with oocytes at different stages. D-E Histological gonadal sections of juveniles reared at 27°C or treated to 37°C at the sexing time (2 months after the end of the treatment) D: Normal ovary of a 27°C juvenile control with different stages of oocytes: primary oocytes (Oo), primary perinuclear (PN1), secondary perinuclear (PN2),

previtellogenic (PVF), vitellogenic (V) and atretic (AT) oocytes. E: A 37°C-treated ovary showing cellular disorganisation with absence of oocytes but presence of follicular cells (FC), steroid producing cells (SPC), atretic follicles (ATV) and phagocytic residuals (P) are observed. 122

Figure 34. Vasa immunochemistry of the female gonads of fry (A-D) and juvenile (E,F) tilapia exposed to either 27°C or 37°C for 60 days, at the sexing-time A: Section of a 27°C control ovary exhibiting Vasa staining of germ cells, in the "zona pellucida" (blue arrow) and cytoplasm of oocytes, while no Vasa staining, indicating absence of germ cells, was observed in B sterile string-like gonad (SG-STL), in C sterile translucent gonad (SG-TSL) and in D the sterile portion of a partially sterile gonad (PSG). E: Section of a 27°C juvenile ovary showing Vasa reaction on a primary perinuclear oocyte (PN1). F: Few germ cells are observed in a section of a 37°C juvenile-treated ovary. G: Graph showing the % vasa labelled cells in 27°C reared fry (red) from progeny P3 at the sexing-time, and values for the 37°C fry-treated females showing intermediate values for the PSG (green), and very low values found in the SG-STL (blue) and SG-TSL (yellow). 123

Figure 35. PCNA immunochemistry of female gonads of fry exposed to either 27°C or 37°C for 60 days, at the sexing-time **A**: 27°C control ovary with PCNA staining (asterisk) in nucleus of most oocytes at different stages and in some follicular cells. **B-D**: Low PCNA staining observed in the gonads of 37°C-treated fry, indicating decreased proliferation. **B**: sterile string-like (SG-STL), **C**: translucent (SG-TSL) gonads show few somatic cells PCNA-positive also seen in the sterile portion of a partially sterile gonad (PSG) gonads **D**, while the fertile region **E** showed abundant proliferation. **F**: Graph showing the % surface area PCNA-labelled, for all the gonad categories. Each value represents the mean±SEM. The differences are significant with *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.005$, Fisher's exact test. 124

Figure 36. Cell apoptosis of germ cells in the gonads of 37°C-treated fry (**A-D**) and juveniles (**E-F**) visualized by the TUNEL assay **A**: Few or no TUNEL-positive cells are observed in 27°C fry ovaries with increased in TUNEL-positive cells (black arrow) in sterile string-like (SG-STL) **B**, and translucent (SG-TSL) **C** gonads, with a few TUNEL-positive cells in **D** partially sterile gonad (PSG). **E**: Control juvenile ovary with few or not apoptotic cells. **F**: 37°C-treated juvenile gonad with many apoptotic cells. **G**: Graph showing the quantification of TUNEL labelling (% labelled area) in fry fish reared at

normal 27°C and treated at 37°C. Each value represent the mean \pm SEM. *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.005$, Fisher's exact test.	125
Figure 37. Transcript levels of the germ cell marker gene vasa analysed in the trunks of 27°C controls and 37°C treated fry at 4 and 15 days, and in gonads at 30 days of treatment. Each value represent the mean \pm SEM. P2: progeny 2 (n=6); P3: progeny 3 (n= 6). $P > 0.05$, Mann Whitney test.....	126
Figure 38. Transcript levels of (A) the germ cell-marker gene vasa(B)the granulosa-marker gene cyp19a1a and (C)the granulosa and Sertoli-marker gene amhanalysed in the gonads of 27°C controls and 37°C treated juveniles after 60 days of treatment (60 DT) and at 2 months after the end of treatment (2 MAT). Each value represent the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, Mann Whitney test.....	126
Figure 39. Visualisation de la structure et des différents types cellulaires testiculaires. A : Coupe transversale représentant la structure d'un testicule mûre. B-D : Coupes transversales regroupant les cellules de la lignée germinale mâle et somatiques. E : amplification de D représentant un cluster de cellules somatiques de Leydig. TA : tunique albuginée, PT : parenchyme testiculaire, CxE : canaux efférents, SPGA : spermatogonie de type A, SPGB : spermatogonie de type B, SPI : spermatocyte I, SPII : spermatocyte II, St : spermatides, SC : cellules de Sertoli, LC : cellules de Leydig. La ligne en pointillée noire entoure un tube séminifère englobant des cystes de spermatocytes et de spermatides.	145
Figure 40. Diagramme schématique représentant les expérimentations aux fortes températures de 36 et 37°C sur des mâles génétiques XY tilapias du Nil alevins (10 dpf) et juvéniles (110 dpf). DT : jour de prélèvement, ET: fin du traitement, MAT: mois après la fin du traitement, S: sexage.	147
Figure 41. Etude de l'effet des traitements stérilisants de 37°C sur les gonades des mâles génétiques XY alevins et juvéniles de tilapias du Nil à différents niveaux et comparaisons des groupes traités XY-37°C avec les groupes témoins XY-27°C	148
Figure 42. Gonad macroscopy and histological gonadal sections of 37°C fry-treated males for 60 days,at four months after the end of the treatment. A,B,C:Three gonads showing different degrees of sterilization at 37°C, partially sterile (PS – A), translucent (TSL – B) and partially translucent (PTSL – C) gonads. D,E,F: Hematoxylin/eosin staining. D:Section of a testisof a 27°C fish with lobules containing cysts of spermatocytes I and II (SPI, SPII) and spermatids (St), separated by interstitial tissue with epithelial and	

spermatogenic Leydig cells (LC). E: Section of a translucent gonad of a 37°C treated male with total cellular disorganization and absence of germ cells, showing interstitial area (IA) containing epithelial and Leydig cells and spermatic fluid (SF) lacking spermatozoa in the efferent ducts. F: Partially translucent gonad with two distinct parts, one fertile with many cysts of spermatic cells (PF, surrounded with a stippled line) and another apparently sterile section with absence of germ cell cysts (PSt). Black arrow: fertile spermatic part and white arrow: sterile translucent area. Scale bars: A-C=1 cm, D = 50 µm, E = 100 µm and F = 2,5 mm..... 165

Figure 45. Treatment of 37°C in juveniles results in total germ cells depletion leading to permanent sterility in translucent gonads at two months after the end of the treatment. A,B: DAPI stained nuclei of all cellular types in control gonad (A, Juv-27°C) and in sterile translucent treated gonad (B, Juv-37°C-TSL). C,D: immunohistochemistry of Vasa-stained germ cells in a Juv-27°C gonad (C), with active spermatogenesis; Vasa protein is detectable in the cytoplasm of spermatogonia (Sg) and spermatocytes I (SPI) but absent in spermatocytes II and spermatids (St). In contrast, no signal is shown in Juv-37°C-TSL gonads (D), revealing total germ cell depletion, but interstitial area (IA) and somatic cells are seen. E: % of Vasa-immunopositive cells in juvenile male gonads. Each value represents the mean ± SEM (n=2-3) and n=1 for PSG. Scale bar of A-D = 50 µm. a significantly different from b with $p < 0.05$ 166

Figure 43. Histological sections of gonads from 37°C fry-treated males for 60 days at the time of the sexing, four months after the end of the treatment, with Vasa and PCNA immunolocalization and TUNEL activities. A-D: Hematoxylin/eosin staining, E-H: Vasa Immunohistochemistry, I-L: TUNEL assay, M-P: PCNA immunohistochemistry. A,D,G,J: Control male gonads at 27°C showed cysts of spermatogonia (Sg), spermatocytes (Sc), spermatids (St), efferent ducts (ED) and Leydig cells (LC) in interstitial tissue, representative of normal spermatogenesis. B,F,J,N: Partially sterile gonads (PS) of 37°C-treated fry where a fertile portion can be distinguished (PF, surrounded with a stippled line)- C,G,K,O showing similar cellular structure to 27°C gonads and D,H,L,P a sterile portion (PSt) with absence of germ cells, but presence of interstitial tissue with somatic Leydig cells. Scale bars of B, F, J, N = 500 µm. Scale bar of C, D, K, L, O, P = 250 µm. Scale bar of A, E, G, H, I, M = 100 µm..... 168

Figure 44. Quantification (%) of vasa-stained germ cells, apoptotic area and PCNA proliferating cells in gonads from 27°C reared males and 37°C fry-treated males for 60

- days, at four months after the end of the treatment. A: % Vasa-immunopositive areas. B: % PCNA-immunopositive area. C: % gonad area labelling by TUNEL. Each value represents the mean \pm SEM (n=2-3); $p>0.05$ 169
- Figure 46. Apoptosis activity in male gonads of juveniles exposed to 37°C for 60 days at the time of the sexing, two months after the end of the treatment. TUNEL assay of a 27°C fish gonad (A – XY-27°C) and a partially sterile gonad of 37°C-treated males (B - 37°C-PS) and a translucent sterile gonad (C – SG-37°C-TSL). Apoptotic cells are shown with a black arrow. Each value represents the mean \pm SEM (n=2-3). Scale bar of A-C = 50 μ m. a significantly different from b with $p<0.05$ 169
- Figure 47. Relative expressions of the germ-cell *vasa* gene and the Sertoli-marker *amh* gene in XY juveniles. A: *vasa* gene expressions; B: *amh* gene expressions of gonads at the end of the 60 days of treatment (60 DT) and 2 months after the end of treatment (2 MAT). Each value represents the mean \pm SEM. (n=5-7), significantly different from b with $p<0.05$ 170
- Figure 48. Macroscopie des gonades des mâles exposés à 37°C au stade alevin (10 dpf) pendant 60 jours, au moment du sexage 4 mois après l'arrêt du traitement. A-C : Male XY à la température normale de 27°C montrant différents stades de spermatogenèse. D-F : Différents types de stérilisation des gonades mâles XY traitées à 37°C : gonades partiellement translucides (PTSL), partiellement stérile (PS) et partiellement "string-like" (PSTL). 176
- Figure 49. Histologie des gonades des mâles exposés à 37°C au stade alevin (Fry - 10 dpf) pendant 60 jours, au moment du sexage 4 mois après l'arrêt du traitement. A-B : Male XY à la température normale de 27°C montrant une spermatogenèse active. C-H : Structure cellulaire des types de stérilisation des gonades mâles XY traitées à 37°C : gonades partiellement stériles (PS, C-E), gonades partiellement translucides (PTSL, F-H). La ligne pointillée noire entoure la partie fertile (PF), l'autre partie dépourvue en cellules germinales est dite stérile (PSt). Dans les parties fertiles, de nombreux tubes séminifères sont visibles (ligne pointillée rouge). 177
- Figure 50. Diagramme schématique représentant les expérimentations busulfan par injection à une dose de 40 mg/kg de poids vif sur une descendance mixte (XX/XY), âgée de 55 dpf ou dans l'aliment, à différentes doses (40, 80 et 160 mg/kg d'aliment) chez des descendances monosexes femelles (XX) et monosexes mâles (XY) de tilapias du Nil âgées de 10 dpf. 179

Figure 51. L'analyse comparative des groupes traités au busulfan (Bf), par injection intra-péritonéale ou incorporé dans l'aliment, avec les groupes 27°C, placebos ayant reçus uniquement l'injection de DMSO/Ringer ou témoins ayant reçus l'aliment classique, a été menée à trois niveaux. A l'échelle macroscopique (niveau 1), nous avons étudié l'impact du traitement au busulfan sur les sex-ratios et les phénotypes gonadiques des groupes d'individus traités. A l'échelle cellulaire (niveau 2), nous avons comparé la structure cellulaire des gonades de 4µm des individus traités avec celle des 27°C et nous avons aussi visualisé la présence des cellules germinales par immunohistochimie de la protéine vasa. A l'échelle moléculaire (niveau 3), nous avons étudié le profil d'expression de trois gènes marqueurs de types cellulaires : *vasa*, marqueurs des cellules germinales chez les mâles et femelles, *amh*, marqueur des cellules somatiques de Sertoli chez les mâles et *cyp19a1a*, marqueur des cellules somatiques de la granulosa chez les femelles. 182

Figure 52. Lors du sexage, 8 mois après l'injection, 1 seul individu femelle avec une conformation atypique a été retrouvé dans le groupe BfI40. Ce phénotype gonadique a été classé comme une "gonade partiellement stérile" (PS). 185

Figure 53. Structure cellulaire des gonades des individus Placebos et traités à 55 dpf par une injection intra-péritonéale de busulfan à la dose de 40 mg de busulfan/kg de poids vif. Coloration hématoxyline- éosine. (A) Coupe de gonade mâle Placebo 30 jours après l'injection à 85 dpf. B : Coupe de gonade femelle Placebo 60 jours après l'injection à 115 dpf. C-E : Coupes de gonades mâles injectées à la dose de 40 mg de busulfan / kg de poids vif, 30 jours après l'injection à 85 dpf (C) et 60 jours après l'injection à 115 dpf (D,F). (E) Coupe de gonade femelle traitée 30 jours après l'injection à 85 dpf. Les gonades des femelles Placebos et injectées au busulfan présentent un développement ovarien normal caractérisé par la présence d'ovocytes à différents stades: ovogonies (Oo), follicules pré-vitellogéniques (PVF) et vitellogéniques (VF), des cellules folliculaires (CF). Les gonades des mâles Placebos et injectés au busulfan présentent un développement testiculaire normal avec la présence de tubes séminifères (entourés en jaune) composés de cystes de spermatogonies, spermatocytes (Sc) et spermatides et des canaux efférents (CxE). La tunique albuginée (TA), enveloppe externe du testicule, est visible chez les mâles placebos et BfI40. 186

Figure 54. Structure cellulaire des gonades femelles et mâles contrôles à 27°C et traitées au busulfan. Coloration hématoxyline-éosine. (A) Coupe de gonades femelles contrôles à la fin des 60 jours de traitement. (D) Coupe de gonades femelles traitées à la dose de 80 mg

de busulfan/kg d'aliment, à la fin des 60 jours de traitement (70 dpf). Les gonades des femelles contrôles et traitées présentent un développement ovarien normal par la présence d'ovocytes à différents stades : ovogonies (Oo), follicules péri-nucléaires primaires et secondaires (PN1 et PN2). (B) Coupe de gonades mâles contrôles 30 jours après la fin du traitement à 90 JT (100 dpf). (D) Coupe de gonades mâles traitées à la dose de 80 mg de busulfan/kg d'aliment 30 jours après la fin du traitement à 90 JT (100 dpf). (C) Coupe de gonades mâles contrôles, à la fin des 60 jours de traitement (70 dpf). (F) Coupe de gonades mâles traitées à la dose de 80 mg de busulfan/kg d'aliment, à la fin des 60 jours de traitement (70 dpf). Les gonades des mâles contrôles et traités présentent un développement testiculaire normal caractérisé par la présence de tubes séminifères (entourés en jaune) composés de cystes de spermatogonies, spermatocytes et spermatides et des canaux efférents (CxE). La tunique albuginée (TA), enveloppe externe du testicule, est visible chez les mâles contrôles, Bf80 et Bf160. JT, jours de traitement..... 190

Figure 55. Visualisation de la localisation des cellules germinales dans les gonades femelles et mâles contrôles à 27°C et traitées au busulfan, par immunohistochimie de la protéine Vasa. (A) Coupe de gonades femelles contrôles à la fin des 60 jours de traitement (70 dpf). (D) Coupe de gonades femelles traitées à la dose de 80 mg de busulfan / kg d'aliment, à la fin des 60 jours de traitement (70 dpf). (B) Coupe de gonades mâles contrôles 30 jours après la fin du traitement à 90 JT (100 dpf). (D) Coupe de gonades mâles traitées à la dose de 80 mg de busulfan/kg d'aliment 30 jours après la fin du traitement à 90 JT (100 dpf). (C) Coupe de gonades mâles contrôles, à la fin des 60 jours de traitement (70 dpf). (F) Coupe de gonades mâles traitées à la dose de 80 mg de busulfan/kg d'aliment, à la fin des 60 jours de traitement (70 dpf). Les gonades des femelles contrôles et traitées présentent un marquage cytoplasmique de leurs ovogonies (oo) et follicules péri-nucléaires primaires et secondaires (PN1 et PN2). Les gonades des mâles contrôles et traités présentent un fort marquage au niveau de leurs cystes de spermatogonies (Sg) et de spermatocytes (Sc) et spermatides (St). Ce signal est très affaibli, voire inexistant dans les spermatides. JT, jours de traitement..... 191

Figure 56. Histogrammes représentant le profil d'expression du gène *vasa* chez 4 descendance. 2 sont des descendance monosexes femelles, l'une traitée à 40 mg de busulfan/kg d'aliment (OnB XX-S) et l'autre à une dose de 160 mg/kg d'aliment (OnM1 XX-N). Pour chacune, les groupes de femelles contrôles sont représentés en rouge et les

groupes de femelles traitées au busulfan en violet. Les 2 autres descendance sont monosexes mâles, l'une traitée à 80 mg de busulfan/kg d'aliment (OnM1 XY-G) et la seconde à 160 mg de busulfan/kg d'aliment (OnM1 XY-O). Pour chaque descendance, les groupes de mâles contrôles sont représentés en bleu et les groupes de mâles traités au busulfan en orange. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM. Pour les descendance OnM1 XY-G, OnM1 XY-O et OnM1 XX-N, chaque valeur représente n = 4 à 8 troncs ou gonades. MNE, Expression de Normalisation Moyenne ; JT, jours de traitement. .. 193

Figure 57. Histogrammes représentant le profil d'expression du gène *amh* chez 3 descendance. 1 est une descendance monosex femelle traitée à une dose de 160 mg/kg d'aliment (OnM1 XX-N). Le groupe de femelles contrôles est représenté en rouge (XX 27°C) et le groupe de femelles traitées au busulfan en violet (XX Bf160). Les 2 autres descendance sont monosexes mâles, l'une traitée à 80 mg de busulfan/kg d'aliment (OnM1 XY-G) et la seconde à 160 mg de busulfan/kg d'aliment (OnM1 XY-O). Pour chaque descendance, les groupes de mâles contrôles sont représentés en bleu (XY 27°C) et les groupes de mâles traités au busulfan en orange (XY Bf80 et XY Bf160). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM. Pour les descendance OnM1 XY-G, OnM1 XY-O et OnM1 XX-N, chaque valeur représente n = 4 à 8 troncs ou gonades. MNE, Expression de Normalisation Moyenne ; JT, jours de traitement. 196

Figure 58. Histogrammes représentant le profil d'expression du gène *cyp19ala* chez 3 descendance. 1 est une descendance monosex femelle traitée à une dose de 160 mg/kg d'aliment (OnM1 XX-N). Le groupe de femelles contrôles (XX 27°C) est représenté en rouge et le groupe de femelles traitées au busulfan en violet (XX Bf160). Les 2 autres descendance sont monosexes mâles, l'une traitée à 80 mg de busulfan/kg d'aliment (OnM1 XY-G) et la deuxième à 160 mg de busulfan/kg d'aliment (OnM1 XY-O). Pour chaque descendance, les groupes de mâles contrôles sont représentés en bleu (XY 27°C) et les groupes de mâles traités au busulfan en orange (XY Bf80 et XY Bf160). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM. Pour les descendance OnM1 XY-G, OnM1 XY-O et OnM1 XX-N, chaque valeur représente n = 4 à 8 troncs ou gonades. MNE, Expression de Normalisation Moyenne ; JT, jours de traitement. 197

Figure 59. Analyse de l'expression de gène marqueur de types cellulaires chez la descendance juvénile mixte XX/XY. Vasa est un marqueur des cellules germinales primordiales et l'amh un marqueur des cellules de Sertoli, aussi impliqué dans le développement testiculaire chez les mâles. A : Représentation graphique de l'expression du gène vasa

dans les gonades des individus mixtes à la fin du traitement (ET) et 2 mois après la fin du traitement (2 MAT). B : Représentation graphique de l'expression de l'amh dans les gonades de la descendance mixte à la fin du traitement de 60 jours (ET) et 2 mois après la fin du traitement. Chaque valeur représente la moyenne plus ou moins l'écart à la moyenne. Le groupe mixte à 27°C est représenté en gris (n=5-6) et le groupe mixte à 37°C en jaune (n = 6-7) ; * $P < 0.05$ 262

Annexes

Liste des annexes

Annexe 1 Protocole de cytométrie en flux : quantification des cellules germinales (DDX4/MVH ou Vasa), des cellules apoptotiques (Caspase-3) et de la prolifération cellulaire (PCNA)	259
Annexe 2 des résultats des articles n°1 et n°2	262
Annexe 3 Travaux personnels	263

Annexe 1 Protocole de cytométrie en flux : quantification des cellules germinales (DDX4/MVH ou Vasa), des cellules apoptotiques (Caspase-3) et de la prolifération cellulaire (PCNA)

Préparation du matériel biologique

Chaque gonade sexuellement mûres (testicules ou ovaires) est hachées mécaniquement avec un scalpel dans une solution de Hank's équilibré en sels (Biochrom). Les fragments de tissus sont ensuite traités avec 0,34 mg/ml de collagénase XI (Sigma-Aldrich) pour libérer les cellules dans du milieu Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Biochrom) pendant 2 heures à 27,5°C. Le DMEM est milieu nutritif utilisé notamment pour la culture de cellules gonadiques. Après incubation, les cellules sont centrifugées 10 min à 125g et lavées avec la solution de Hank's. Les débris et les agrégats cellulaires sont éliminés par une centrifugation de 10 min à 125g, puis des étapes de filtrations successives avec des tailles de pores différentes sont réalisées (100,50,20µm, selon la taille de la gonade et le type gonadique, testicule versus ovaire). Après un dernier lavage, les cellules sont récoltées par centrifugation 10 min à 125g.

Remarque : il est nécessaire de noter la concentration cellulaire de chaque échantillon et pour la suite de la manipulation, d'établir une concentration appropriée de cellules identiques pour tous les échantillons (effectuer une dilution si un échantillon cellulaire est trop concentré).

Comptage cellulaire avec une cellule de Malassez

Le comptage cellulaire détermine le nombre de cellules contenues dans un volume précis de liquide ; il est exprimé en concentration cellulaire (nombre de cellules par litre ou millilitre). Cette numération est réalisée par observation au microscope au grossissement 40x de la suspension cellulaire à l'aide d'une lame de comptage spéciale, ici la cellule de Malassez. Cette cellule possède un quadrillage comportant 100 rectangles avec un volume de quadrillage de 1µl.

La première étape est la préparation d'un volume de cellules avec du bleu trypan en utilisant une dilution soit au 1/2 (25 µl de cellules suspendues + 25 µl bleu trypan), soit au 1/10 (10 µl de cellules suspendues + 90 µl bleu trypan). Le bleu de trypan colore les cellules mortes ; il

pénètre à l'intérieur de toutes les cellules, mais seules les cellules vivantes *via* l'énergie produite par l'ATP sont capables de l'éjecter en dehors de leur cytoplasme.

La seconde étape est le remplissage de la cellule de numérotation avec cette 1 µl de cette solution cellulaire + bleu trypan. Le remplissage de la chambre de comptage se fait par capillarité en plaçant la micropipette contenant la solution cellulaire entre la lame et la lamelle. Attendre 2 à 3 min avant de procéder au comptage.

La troisième étape est le comptage cellulaire en observant dans un premier temps la cellule de Malassez à l'objectif 10 pour repérer le quadrillage, et dans un deuxième temps à l'objectif 40 pour la numération.

Les cellules visibles présentes dans 10 rectangles ont été comptabilisées pour la numération(en excluant les cellules morte de couleur bleue).

La quatrième étape est le calcul de la concentration cellulaire qui est donné par la formule suivante : $C = n \times 10$ (pour 100 rectangles = 1 µl) $\times d \times 10^3$ (pour ml)

C = nombre de cellules par ml, n = nombre de cellules comptées (10 rectangles), d = dilution (facteur 2 ou 10)

Remarque : le minimum est de 300 000 cellules par puits, l'idéal étant 1 000 000 de cellules par puits. On travaille sur plaque de 96 puits.

Immunomarquage

La cytométrie de flux est une technique quantitative, mais aussi qualitative, permettant de classer des populations cellulaires en suivant plusieurs critères et de les trier au sein d'une suspension cellulaire. Ces différents critères sont identifiées par exemple avec le marquage spécifique d'une protéine d'intérêt avec un anticorps primaire dirigé contre cette protéine. Ensuite, une hybridation secondaire à l'aide d'un anticorps couplé à un fluorochrome est utilisée pour révéler le marquage. Puis la suspension cellulaire est analysée en cytométrie de flux, les cellules défilant devant le faisceau d'un laser. C'est la lumière réémise par fluorescence qui permettra ensuite de classer ces différentes populations cellulaires selon les critères choisis.

Le kit "Fix and Perm" (Invitrogen) est utilisé selon les recommandations du fournisseur pour les étapes de fixation et perméabilisation des cellules.

L'étape de fixation est réalisée en ajoutant 100 µl de réactif A par puits. Après une incubation à température ambiante pendant 15 min à l'obscurité, la plaque 96 puits est centrifugée à 125g

pendant 10 min à température ambiante et le surnageant est retiré. Les cellules sont ensuite lavées dans une solution de PBS + 5% de FBS (sérum de veau fœtal) + 0,1% d'azide de sodium. Après 5 min d'incubation, la plaque est à nouveau centrifugée à 125g pendant 10 min et le surnageant est enlevé.

L'étape de perméabilisation est réalisée en même temps que l'incubation avec l'anticorps primaire. Chaque anticorps primaire est dilué dans le réactif B (perméabilisation). Après avoir effectué les titrages de chacun des anticorps primaires, nous avons utilisé l'anticorps polyclonal de lapin anti-DDX4/MVH (Vasa) (Abcam, ab13840) au 1/400 pour quantifier les cellules germinales primordiales, l'anticorps polyclonal de lapin anti-active Caspase 3 (abcam, ab13847) au 1/200 pour quantifier les cellules apoptotiques et l'anticorps monoclonal de souris anti-PCNA [PC10] (Dako, M0879) au 1/100 pour quantifier les cellules en prolifération. Les cellules sont resuspendues dans chacun des trois anticorps primaires (ACI) énumérés ci-dessus et incubées une nuit à 4°C (14-16h). Puis les cellules sont récoltées le lendemain par centrifugation 10min à 220g et lavées 2 fois avec du PBST (0,2%).

Remarque : attention de procéder aux contrôles négatifs suivants pour le calibrage de la manip :

- **H2O + ACI + ACII**
- **Suspension cellulaire + isotype control lapin (IgG polyclonal lapin, abcam, ab27472) + ACII anti-lapin**
- **Suspension cellulaire + isotype control souris (IgG2a souris, abcam, ab91361) + ACII anti-souris**

L'étape suivante est la révélation par l'anticorps secondaire (ACII) couplé à la fluorescence. Les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires (ACII) dilués dans du PBST pendant 2h à 4°C et à l'obscurité. L'ACII de chèvre F(ab')₂ anti-souris IgG eFluorR 660 (eBioscience, 50-4010) est dilué au 1/100 et couplé à l'ACI souris anti-PCN. L'ACII d'âne F(ab')₂ anti-lapin IgG PE (eBioscience, 12-4739) est dilué au 1/50 quand il est couplé à l'ACI lapin anti-DDX4/MVH et il est dilué au 1:100 avec l'ACI lapin anti-active Caspase3. Les cellules sont resuspendues dans la solution de Hank's et sont mesurées immédiatement par Cytométrie en flux avec le cytomètre CyFlowSpace de chez Partec.

Acquisition et analyse des données.

Les données sont acquises et analysées grâce au logiciel FloMax 6.0 de chez Partec. En prenant en référence un contrôle négatif (H2O au lieu de cellules testiculaires ou ovariennes), un seuil de fluorescence spécifique est défini et les données des cellules mesurées sont divisées en 2 groupes : les cellules positives à notre anticorps *versus* celles qui ne le sont pas.

Annexe 2 des résultats des articles n°1 et n°2

Nous avons également procédé aux analyses expressionnelles des gènes marqueurs de types cellulaires sélectionnés, *vasa* et *amh*, sur les individus juvéniles provenant de la descendance mixte. Il y a aussi une forte baisse significative des transcrits *vasa* et *amh* dans les gonades des XX/XY 37°C comparé aux XX/XY 27°C à la fin du traitement à 37°C de 60 jours. Et le même profil d'expression est encore visible deux mois après la fin du traitement (2 MAT) (Figure 5).

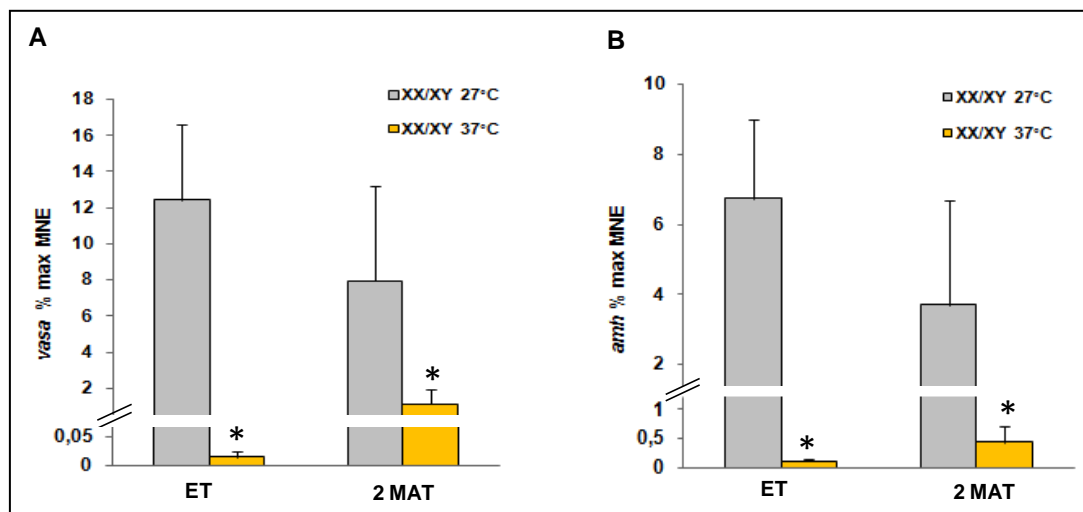


Figure 59. Analyse de l'expression de gène marqueur de types cellulaires chez la descendance juvénile mixte XX/XY. Vasa est un marqueur des cellules germinales primordiales et l'amh un marqueur des cellules de Sertoli, aussi impliqué dans le développement testiculaire chez les mâles. A : Représentation graphique de l'expression du gène vasa dans les gonades des individus mixtes à la fin du traitement (ET) et 2 mois après la fin du traitement (2 MAT). B : Représentation graphique de l'expression de l'amh dans les gonades de la descendance mixte à la fin du traitement de 60 jours (ET) et 2 mois après la fin du traitement. Chaque valeur représente la moyenne plus ou moins l'écart à la moyenne. Le groupe mixte à 27°C est représenté en gris (n=5-6) et le groupe mixte à 37°C en jaune (n = 6-7) ; * P<0.05.

Annexe 3 Travaux personnels

Articles scientifiques

Marie-Raphaëlle Almin, Sandra Marroquín Martinez, Helena D'Cotta, Marc Canonne, Marina Govoroun and Jean-François Baroiller. Cellular and molecular mechanisms of sterility induced by high temperature in female Nile tilapias. Soumis le 2 novembre 2015 dans le journal Molecular of Reproduction and Development

Marie-Raphaëlle Almin, Sandra Marroquín Martinez, Helena D'Cotta, Elodie Pepey, Marc Canonne and Jean-François Baroiller. Elevated-temperatures of 37°C generate morphological and expressional impacts on germ and Sertoli cells of male gonads in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. En cours de rédaction pour la revue Aquaculture

Communication orale au congrès international 17th ICCE, Barcelone, juillet 2013

Elevated-temperatures generate morphological and expressional impacts on germ cells and Sertoli cells of juvenile gonads during sexual maturation in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*

Marie-Raphaëlle Almin, Helena D'Cotta, Elodie Pepey, Marc Canonne, Jean-François Baroiller*. CIRAD Campus International de Baillarguet, Montpellier.

*Corresponding author. Email: baroiller@cirad.fr

In the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* elevated temperatures >32°C applied during sex differentiation affect the sex ratio resulting in a masculinisation of the gonads of genetic XX individuals. However, in several fish species (pejerrey, zebrafish, fugu) and in adult mice, high temperatures are able to induce degeneration and disappearance of germ cells leading to a partial or total sterilization. The cellular and molecular effects of these temperatures have been analysed in the present study on the gonads of sexual maturing juvenile tilapias. High temperatures of 37°C were applied for sixty days (DT60) to juvenile fish belonging to an all-male XY and a mixed-sex XX/XY progenies (110-130 day post fecundation (dpf) and compared to 27°C. At 60 DT, end of the treatment and at 130 DT, (70 days after the end of the treatment, six fish per group were sampled and the effects on the gonads analysed. High temperatures of 37°C caused morphological changes to the gonads. At the macroscopic level, females showed a large reduction in the number of oocytes and males had translucent and

reduced, filiform gonads. At 130 DT, treated fish had a lower gonado-somatic index (GSI), with an average GSI of 0, 07 compared to controls GSI=1. Treated fish had undetermined sex-ratios. Germ cell apoptosis was confirmed by histology. Real-time PCR quantification showed a down-regulation in *vasa* gene expression, a germ cell marker, at 60 DT and this persisted at 130 DT in the 37°C treated fish. The 37°C treatment also affected Sertoli cells because *amh* gene expression was down-regulated compared to controls. The aromatase gene *cyp19a1* remained low in the mixed sex progeny suggesting that the granulosa cells may have also been affected by the 37°C temperatures.

**Présentation d'un poster (support visuel) au 26e colloque Biotechnocentre
les jeudi 10 et vendredi 11 octobre 2013**

**Elevated-temperatures generate morphological and expressional effects on germ cells
and Sertoli cells of juvenile gonads during sexual maturation in a teleost fish : the Nile
tilapia *Oreochromis niloticus***

Etude des mécanismes induits par de fortes températures stérilisantes chez le Tilapia

Résumé

La stérilisation des espèces aquacoles est recherchée en aquaculture pour remédier aux problèmes de reproduction intempestive et risques de pollution génétique de la reproduction des poissons d'élevage échappés avec des espèces endémiques. Nous avons cherché à caractériser certains des mécanismes mis en jeu lors d'une stérilisation induite par de fortes températures chez une espèce de poissons thermosensible d'intérêt majeur en aquaculture, le tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus*. L'effet d'une température élevée de 37°C sur le développement gonadique a été étudié pendant la différenciation sexuelle chez des alevins et pendant la maturation sexuelle chez des juvéniles, provenant de descendance mixtes (XXXY) et monosexes femelles (XX) /mâles (XY). L'analyse immunohistochimique de la protéine vasa montre que des traitements à 37°C provoquent une diminution du nombre de cellules germinales (CG) qui résulte d'une augmentation du taux d'apoptose et/ou d'une réduction du taux de prolifération de ces cellules, aboutissant à une stérilité partielle et transitoire ou complète et permanente. L'expression du gène *vasa*, marqueur des CG, est inhibée dans les gonades des poissons traités à 37°C pendant un minimum de 60 jours ; ceci est corrélé avec la réduction du nombre de CG dans ces gonades. La baisse du niveau d'expression des gènes *cyp19a1a* et *amh*, respectivement marqueurs de cellules somatiques femelles et mâles, suggère que la température de 37°C affecte également le nombre ou la fonctionnalité des cellules de la granulosa chez les femelles et de Sertoli chez les mâles. Un traitement de 60 jours est nécessaire pour induire de tels effets et semble impacter préférentiellement les gonades femelles. Ce travail confirme que les fortes températures induisent une réduction du nombre de CGs, en modifiant la balance entre les taux d'apoptose et de prolifération cellulaire, conduisant à des stérilités partielles ou totales.

Mots clés : stérilisation induite, hautes températures, CG, apoptose cellulaire, prolifération cellulaire.

Résumé en anglais

The sterilization of farmed fishes is searched in aquaculture to remedy in the problems of inconvenient reproduction and risk of genetic pollution of reproduction of escaped farmed fishes into the natural environment with endemic species. We characterized some of the mechanisms involved during induced-sterilization by high temperatures in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, a thermosensitive species of major interest in fish farming. The effect of 37°C-elevated temperature on gonadal development was studied during sexual differentiation in fry and during sexual maturation in juvenile, from mix-sexed (XX/XY), all-genetic female (XX) and male (XY) progenies. The immunochemistry analysis of vasa protein shows that 37°C-treatment causes germ cell (CGs) decrease, resulting from an increase of apoptosis rate and/or reduction of cell proliferation, leading to partial and transitory or complete and permanent sterilization. This work confirms that high temperatures induce a decrease of germ cell number, modifying the balance between rates of cell apoptosis and cell proliferation, leading to partial or complete sterilization. The expression profile of *vasa* gene, marker of germ cells, is inhibited in gonads of fish treated at least during 60 days at 37°C ; that is correlated with the reduction of germ cell number. The reduction of expression levels of *cyp19a1a* and *amh* genes, respectively markers of female and male somatic cells, suggests that the 37°C-temperature also affects the number or function of granulosa cells in females and Sertoli cells in males. A treatment of 60 days is necessary to induce such effects and seems to impact preferentially female gonads.

Key-words : induced-sterilization, high temperatures, germ cell, cell apoptosis, cell proliferation.